



INSTITUTO UNIVERSITÁRIO EGAS MONIZ

MESTRADO INTEGRADO EM MEDICINA DENTÁRIA

A SALIVA COMO MEIO DE DIAGNÓSTICO

Trabalho submetido por
Mariana de Abreu Candeias Santos Fino
para a obtenção do grau de Mestre em Medicina Dentária

Junho de 2018



INSTITUTO UNIVERSITÁRIO EGAS MONIZ

MESTRADO INTEGRADO EM MEDICINA DENTÁRIA

A SALIVA COMO MEIO DE DIAGNÓSTICO

Trabalho submetido por
Mariana de Abreu Candeias Santos Fino
para a obtenção do grau de **Mestre** em Medicina Dentária

Trabalho orientado por
Professora Doutora Maria Fernanda de Mesquita

e coorientado por
Professor Doutor Carlos Manuel Lopes Monteiro

Junho de 2018

Agradecimentos

À minha orientadora, Professora Doutora Maria Fernanda de Mesquita, por toda a dedicação, disponibilidade e ajuda na realização deste trabalho, o meu agradecimento.

Ao meu coorientador, Professor Doutor Carlos Monteiro, por todo o apoio e motivação dados ao longo destes últimos meses.

Aos meus pais Artur e Fátima, por todo o apoio que sempre demonstraram ao longo destes anos e especialmente nesta última fase da minha vida académica. Obrigada por estarem sempre presentes, pela amizade e por fazerem de mim aquilo que sou hoje.

Ao meu irmão Pedro por todo o companheirismo e amizade desde sempre.

Ao meu tio Rui e à minha avó Filomena, por todo o apoio e ajuda incansável nestes últimos meses e ao meu avô Artur, tios e primos, que sempre estiveram ao meu lado, por todo o carinho e apoio.

Às minhas grandes amigas Mariana Ferreira e Helena Fonseca, por toda a amizade, carinho e apoio ao longo destes 5 anos que passámos juntas. Não poderia ter tido melhores companheiras para ultrapassar todas as peripécias durante os anos de faculdade, tanto a nível pessoal como académico. Que nos esperem longos anos juntas e que esta grande amizade se mantenha e fortaleça.

Às minhas amigas Margarida Fernandes, Margarida Cruz e Francisca Cadete, por toda a amizade que se manteve, após seguirmos caminhos diferentes, e por toda a alegria e momentos bons que a sua companhia traz à minha vida.

Às minhas amigas que estão mais longe, Magda, Jessy, Tineke e Anjola, que ao mesmo tempo sempre estiveram o mais presentes possível, por toda a amizade e palavras de apoio que me deram ao longo destes anos.

RESUMO

A saliva é um biofluido complexo e multifuncional. As diversas moléculas que fazem parte da sua composição podem atuar como verdadeiros biomarcadores, refletindo, em cada momento, o estado de saúde ou de doença de um indivíduo. A utilização da saliva para deteção e monitorização de doenças e de resposta a tratamentos tem suscitado o interesse de muitos investigadores devido ao carácter simples, económico e não invasivo da sua colheita. Estas características tornam a colheita salivar uma alternativa viável a métodos mais desconfortáveis de diagnóstico, como a recolha sanguínea e urinária, facilitando a receptividade da população a este meio de diagnóstico, o que pode possibilitar a deteção precoce de determinados estados de doença, através da identificação de biomarcadores salivares específicos. Estes, individualmente ou em combinação, podem estar associados a inúmeras doenças orais e sistémicas, favorecendo a deteção precoce das mesmas após a análise salivar. Na área da medicina dentária, as doenças que apresentam maior impacto a nível global são o cancro oral, a cárie dentária e a doença periodontal. Devido à sua prevalência bastante elevada, é importante a deteção precoce destas doenças de modo a intervir em fases iniciais das mesmas, aplicando tratamentos adequados e prevenindo a sua evolução para estadios mais avançados e mórbidos, com consequências severas para a qualidade de vida dos doentes. Os principais obstáculos deste método devem ser ultrapassados de modo a melhorar os promissores resultados atuais, investindo na realização de múltiplos estudos em populações mais abrangentes e no desenvolvimento de novas tecnologias de colheita e análise, recorrendo cada vez mais à combinação de biomarcadores.

Palavras-chave: biomarcadores salivares; cancro oral; cárie dentária; doença periodontal

ABSTRACT

Saliva is a complex and multifunctional biofluid. The various molecules that are part of its composition may act as true biomarkers, reflecting at every moment the state of health or illness of an individual. The use of saliva for disease detection and monitoring and treatment response has been of interest to many researchers due to the simple, economic and non-invasive nature of their collection. These characteristics make salivary collection a viable alternative to more uncomfortable methods of diagnosis, such as blood and urine collection, facilitating the population's receptivity to this diagnostic medium, which may allow the early detection of certain disease states by identifying of specific salivary biomarkers. These, individually or in combination, may be associated with numerous oral and systemic diseases, favoring their early detection after salivary analysis. In the area of dentistry, the diseases with the greatest impact at the global level are oral cancer, dental caries and periodontal disease. Due to their high prevalence, it is important to detect these diseases early in order to intervene in their initial phases, applying appropriate treatments and preventing their evolution to more advanced and morbid stages, with severe consequences for patients' quality of life. The main obstacles to this method must be overcome in order to improve the current promising results, by investing in multiple studies in larger populations and in the development of new collection and analysis technologies, increasingly resorting to the combination of biomarkers.

Key words: salivary biomarkers; oral cancer; dental caries; periodontal disease

ÍNDICE GERAL

<i>ÍNDICE DE FIGURAS</i>	6
<i>ÍNDICE DE TABELAS</i>	7
<i>LISTA DE SIGLAS</i>	8
<i>I - INTRODUÇÃO</i>	11
<i>II – DESENVOLVIMENTO</i>	15
1. A SALIVA	15
1.1. Vantagens da saliva como meio de diagnóstico	18
1.2. Desvantagens da saliva como meio de diagnóstico	18
2. BIOMARCADORES E DIAGNÓSTICO SALIVAR	21
3. A SALIVA NAS DOENÇAS ORAIS	25
3.1. Cancro oral	25
3.2. Cárie dentária	36
3.3. Doença periodontal	43
<i>III – CONCLUSÃO</i>	55
<i>IV – BIBLIOGRAFIA</i>	58

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 - Resumo da composição, propriedades e fisiologia da saliva	16
Figura 2 - Origem dos fluidos e biomoléculas que constituem a saliva	16
Figura 3 - Exemplos de diferentes métodos de recolha salivar	17
Figura 4 - Biomarcadores salivares relacionados com o diagnóstico, prevenção e resposta a tratamento de múltiplas doenças	24
Figura 5 - Lesões suspeitas nas quais se detetou áreas com diferenciação de OSCC após biópsia	25
Figura 6 - Kit salivar para a detecção da presença de HPV-16 associada ao OSCC.....	27
Figura 7 - Metodologia para a seleção e inclusão dos artigos da revisão de J. Kaur et al. (2018)	33
Figura 8 - Cárie dentária	36
Figura 9 - Esquematização do teste SIMMA.....	41
Figura 10 - Periodontite crónica generalizada	44
Figura 11 - Kit PerioSafe®	48

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela I – Parâmetros clínicos que devem ser considerados durante a recolha e processamento de amostras salivares.....	23
Tabela II - Características de mRNAs com concentrações salivares aumentadas em doentes com OSCC	31
Tabela III - Biomarcadores salivares para a detecção do cancro oral	34
Tabela IV - Potenciais biomarcadores salivares para a doença cárie e evidência na literatura dessa associação.....	42
Tabela V - Resultados do estudo de Salminen et al. (2015) relativamente à concentração salivar dos biomarcadores no grupo periodontite moderada a severa e à sua associação com os parâmetros periodontais estudados	45
Tabela VI – Resultados do estudo de Ebersole et al. (2015) no grupo periodontite e respetiva associação entre os biomarcadores em estudo e os parâmetros periodontais estudados	46
Tabela VII - Especificidade e Sensibilidade do teste PerioSafe® aMMP-8 em adolescentes finlandeses.....	49
Tabela VIII – Resultados do estudo realizado por Salminen et al. (2014), relativamente às concentrações salivares de MMP-8, IL-8 e P. gingivalis na periodontite moderada a severa e sua associação significativa com os parâmetros periodontais em estudo	50
Tabela IX - Biomarcadores salivares associados a agentes bacterianos.....	51
Tabela X - Biomarcadores salivares associados à inflamação.....	51
Tabela XI – Biomarcadores salivares associados à destruição de tecidos moles.....	52
Tabela XII – Biomarcadores salivares associados à destruição de tecidos duros.....	53

LISTA DE SIGLAS

ALDH – Aldeído desidrogenase

CA – Antígeno de cancro

CD – *Cluster of differentiation*

CEA – Antígeno carcino-embrionário

DNA – Ácido desoxirribonucleico

DOPM – Doenças orais potencialmente malignas

DUSP – Fosfatase de especificidade dual

ECAD – Caderina-E

EGF – Factor de crescimento epidermal

FCG - Fluido crevicular gengival

GADD45B – *Growth arrest and DNA damage-inducible beta*

H3F3A – Histona H3.3

HA3 – Hemaglutinina 3

HGF – Fator de crescimento do Hepatócito

HIV – *Human immunodeficiency virus* (Vírus da imunodeficiência humana)

HPV – *Human papillomavirus* (Vírus do Papiloma Humano)

HS – Hemorragia à sondagem

IFN- γ – Interferão gama

Ig – Imunoglobulina

IL – Interleucina

IP-10 – Proteína 10 induzida pelo interferão gama

K-10 – Queratina-10

M2BP – Proteína de ligação a Mac2

MGMT – O(6)-Metilguanina-DNA Metiltransferase

MIP – Proteína inflamatória de macrófago

miRNAs/miR – MicroRNAs

MMP – Proteína de Matriz Metaloproteinase

MRP – Proteína associada ao mielóide

MUC – Mucina

mRNA – RNA mensageiro

OAZ1 – Antizimina ornitina descarboxilase

OPG – Osteoprotegerina

OSCC – *oral squamous cells carcinoma* (carcinoma oral de células escamosas)

PIP – Perda de inserção periodontal

POA – Perda de osso alveolar

PS – Profundidade de sondagem

PTEN – Fosfatase homóloga a tensina

RANKL – Ativador de receptor do fator kappa B nuclear ligando

RGS – Regulador da sinalização por proteína G

RNA – Ácido ribonucleico

S100P – Proteína transportadora de cálcio

SAT – *spermidine/ spermine N1-acetyltransferase*

TIMP – Inibidor tecidual de metaloproteinase

TLR – Recetor do tipo Toll

TMEFF2 – Proteína transmembranar

TNF – Fator de necrose tumoral

I - INTRODUÇÃO

A saliva é um fluido biológico presente na cavidade oral com diversas funções importantes para o funcionamento correto do organismo, contribuindo para a saúde oral e também de todo o corpo humano. Tem sido considerada por muitos investigadores como um “espelho do corpo”, visto que tem a capacidade de refletir os diversos estados de saúde ou de doença, permitindo a deteção, monitorização e terapêutica adequadas das mais variadas doenças (Y. H. Lee & Wong, 2009; Lima, Diniz, Moimaz, Sumida, & Okamoto, 2010; Q. Wang, Gao, Wang, & Duan, 2014; A. Zhang, Sun, Wang, & Wang, 2013). É a abundante presença de moléculas na saliva, que atuam como marcadores biológicos específicos, que torna possível a identificação de determinados estados de doença nos diferentes indivíduos (Javaid, Ahmed, Durand, & Tran, 2016).

Atualmente o sangue é o fluido corporal mais utilizado como meio de diagnóstico e pensa-se que existe uma correlação entre a composição do sangue e da saliva, pressupondo uma interligação molecular entre os dois fluidos (Yoshizawa et al., 2013). A relação molecular que se estabelece entre ambos os fluidos é explicada pelo facto de existirem vários processos (difusão passiva, transporte ativo e ultrafiltração) através dos quais o fluido da cavidade oral recebe biomoléculas transferidas do sangue (Javaid et al., 2016). A concentração salivar destas moléculas e/ou a sua possível variação facilita a identificação de estados biológicos de saúde, de doença ou até mesmo respostas do organismo a determinados tratamentos. Conforme se verifica a presença de múltiplos componentes em comum no sangue e na saliva, tais como DNA, RNA, proteínas, lípidos, anticorpos, metabolitos, microrganismos, entre outros, também é possível sugerir e investigar a hipótese da análise salivar como um potencial método de diagnóstico alternativo à análise sanguínea (Javaid et al., 2016; Y. H. Lee & Wong, 2009).

A análise salivar tem como principais objetivos a deteção e identificação de doenças, bem como a monitorização terapêutica (Pezelj-Ribaric, Prpic & Glazar, 2015). O conceito da análise salivar, com o objetivo de conhecer o estado de saúde ou de doença de um indivíduo, surgiu em 1975 com Dawes, que afirmou que se justificava a criação de um novo método de diagnóstico através da saliva, devido não só à facilidade de recolha de amostras, como também da possibilidade de adquirir as mais variadas informações dos constituintes presentes neste fluido biológico (Lima, Sales, Correia, Lima, & Anjos, 2014).

Assim, a utilização da saliva como um meio de diagnóstico clínico e laboratorial tem vindo a despertar o interesse de muitos investigadores, uma vez que permite alcançar diagnósticos fáceis, rápidos e não invasivos (Malamud & Rodriguez-Chavez, 2011; Zhang et al., 2013). Tal evolução tem contado com o apoio de várias organizações, tendo algumas delas contribuído para o financiamento de novas tecnologias que possibilitem ultrapassar os obstáculos observados nas fases iniciais de diagnósticos salivares. Do conjunto destas organizações, salientam-se as seguintes: *National Institutes of Health* (NIH), *National Institute of Dental and Craniofacial Research* (NIDCR), *American Dental Association* (ADA), *American Association of Dental Research* e *Fédération Dentaire Internationale* (FDI, *World Dental Federation*) (Slowey, 2015).

A saliva é extremamente útil na determinação da suscetibilidade, na monitorização e prognóstico de doenças orais, sendo que nos últimos anos também tem sido explorada como meio de diagnóstico em doenças sistémicas. Apresenta algumas vantagens em relação a outros fluidos mais utilizados como métodos de diagnóstico, tais como o sangue e a urina, nomeadamente em relação à facilidade de colheita, de armazenamento e de transporte. A sua recolha contorna situações desconfortáveis e dolorosas que se verificam na colheita sanguínea e permite, se necessário, a obtenção de diversas amostras a baixo custo, com segurança e sem exigência de pessoal especializado (Javaid et al., 2016; Lima et al., 2010).

O sucesso da análise salivar verificou-se, na cavidade oral, em casos de alto risco de cárie, de doença periodontal e de cancro oral, mas também em casos de doenças sistémicas, de entre as quais se destaca a possibilidade de diagnóstico do Vírus da Imunodeficiência Humana (HIV). A sua utilização estende-se com êxito a outras áreas, assumindo importância em medicina legal e forense e em medicina desportiva, detetando e monitorizando o consumo de drogas estimulantes (Y. H. Lee & Wong, 2009; Nunes, Mussavira, & Bindhu, 2015).

A presente monografia tem como principal objetivo a apresentação e caracterização da saliva como um possível meio de diagnóstico de algumas doenças orais, nomeadamente o cancro oral, a cárie dentária e a doença periodontal, referindo quais os potenciais biomarcadores salivares que têm sido estudados para as mesmas, ao longo dos últimos anos, e que poderão representar um novo método de deteção e monitorização destas doenças, de impacto global conhecido e significativo.

Para a elaboração deste trabalho, foi realizada uma pesquisa bibliográfica nas bases de dados PubMed, Cochrane e ScienceDirect. As palavras-chave utilizadas para a pesquisa foram: “saliva”; “diagnostics”; “salivary biomarkers”; “oral cancer”; “oral squamous cell carcinoma”; “caries”; “tooth decay”; “tooth cavity”; “periodontitis”; “periodontal disease”; com ou sem a combinação dos vários termos. Foram selecionados artigos publicados entre 2000 e 2018, incluindo revisões bibliográficas e estudos/ensaios em populações humanas com um grupo de controlo e um ou mais grupos de indivíduos com uma das doenças orais acima referidas.

II – DESENVOLVIMENTO

1. A SALIVA

A saliva é um biofluido oral, cujo pH se encontra entre 6,5 e 7, constituída maioritariamente por água (98%) e por eletrólitos, muco, compostos antibacterianos e diversas enzimas (2%) (Rathnayake, Gieselmann, Heikkinen, Tervahartiala, & Sorsa, 2017). É produzida essencialmente nas três glândulas salivares major localizadas na boca e na garganta: parótida, submandibular e sublingual. Ainda assim, existe uma pequena contribuição em volume por parte das glândulas salivares minor distribuídas por toda a cavidade oral e pelo fluido crevicular gengival (FCG) para a formação da chamada “saliva total” ou “fluido oral” (Nunes et al., 2015). A saliva é um dos fluidos corporais mais complexos e versáteis e tem uma ação multifuncional no organismo com o objetivo de manter a integridade da cavidade oral e do trato digestivo, facilitando o processo da digestão e controlando as infeções orais que possam surgir (Lima et al., 2010; Pezelj-Ribaric et al., 2015). Algumas moléculas da composição salivar têm potencialidade de serem biomarcadores relacionados com as mais variadas doenças orais e sistémicas, permitindo o diagnóstico e monitorização das mesmas. As características descritas relativamente ao pH, produção diária, secreção, composição, biomarcadores salivares e outras propriedades da saliva total podem ser observadas na Figura 1 (Rathnayake et al., 2017). Os fluidos e as biomoléculas que constituem a saliva provêm das glândulas salivares, das células da mucosa oral, de microrganismos e vírus, do sangue, do FCG e dos alimentos, o que se encontra representado pela Figura 2 (Y. Zhang et al., 2016).

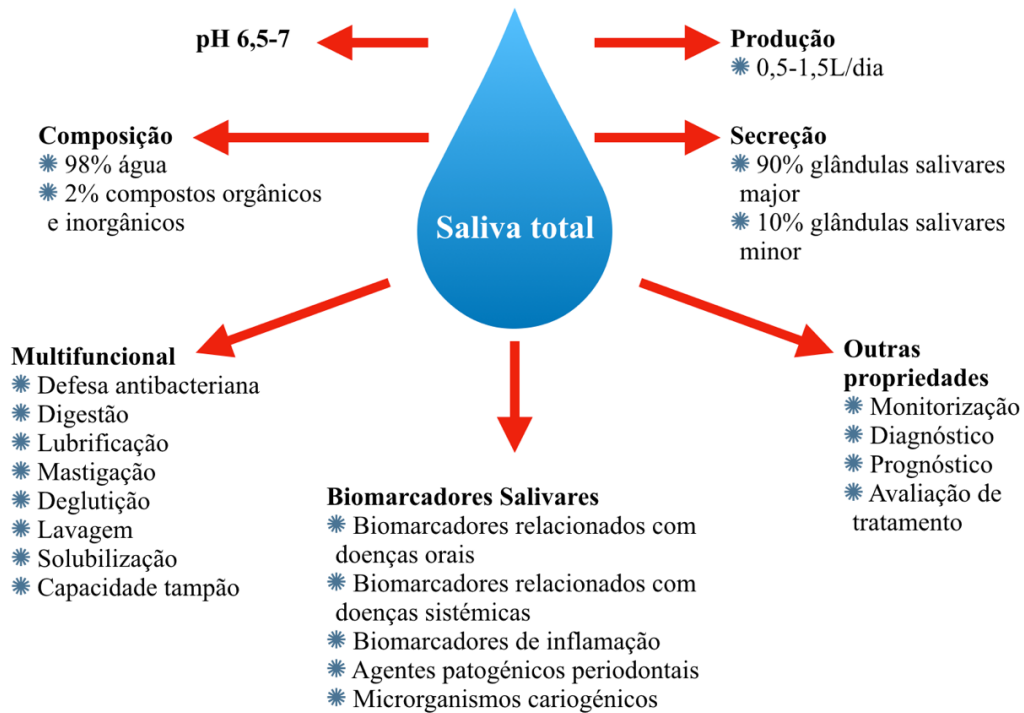


Figura 1 - Resumo da composição, propriedades e fisiologia da saliva (Adaptado de Rathnayake et al., 2017)

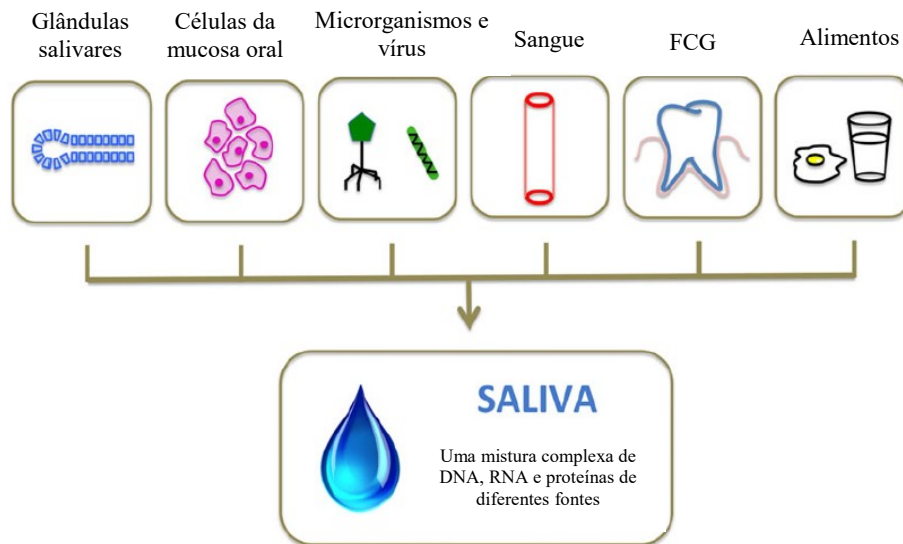


Figura 2 - Origem dos fluidos e biomoléculas que constituem a saliva (Adaptado de: Zhang et al., 2016)

A colheita de saliva total pode ser realizada com ou sem estimulação salivar. A saliva não estimulada (0,1-0,3ml/min) é a saliva acumulada naturalmente na cavidade oral. Esta é

recolhida em tubos de plástico maioritariamente por “*passive drooling*”, podendo também obter-se pela ação de cuspir, por sucção ou com um rolo de algodão absorvente posteriormente centrifugado para a extração da amostra. A recolha de saliva estimulada pode ser realizada por mastigação de uma pastilha elástica ou de parafina (1-3ml/min) ou por aplicação de gotas de ácido cítrico na língua (5-10ml/min), aumentando assim a taxa de fluxo salivar e permitindo a obtenção de uma taxa de fluxo glandular constante durante múltiplas colheitas. Este método torna-se vantajoso desde que não absorva ou altere nenhuma das substâncias a analisar (Chiappin, Antonelli, Gatti, & De Palo, 2007; Gröschl, 2017; Y. H. Lee & Wong, 2009; Nunes et al., 2015; Pfaffe, Cooper-White, Beyerlein, Kostner, & Punyadeera, 2011). Também existe a saliva de glândula específica, quando é diretamente recolhida de apenas uma determinada glândula salivar, através dos ductos glandulares. Este método é útil na identificação de obstruções ou infeções presentes na glândula da qual a amostra foi obtida, bem como na deteção de patologias características das glândulas salivares. Todavia, os aparelhos para recolha deste tipo de saliva constituem um método mais complexo, lento e invasivo, que exige experiência e habilidade do coletor (Deepa & Thirrunavukkarasu, 2010; J. Kaur, Jacobs, Huang, Salvo, & Politis, 2018; Nunes et al., 2015; Pfaffe et al., 2011; A. Zhang et al., 2013). Diferentes métodos de recolha salivar estão representados na Figura 3, nomeadamente, a colheita de saliva total não estimulada, saliva total estimulada, saliva da glândula parótida, saliva da glândula sublingual não estimulada e saliva da glândula sublingual estimulada (Jasim, Olausson, Hedenberg-Magnusson, Ernberg, & Ghafouri, 2016).

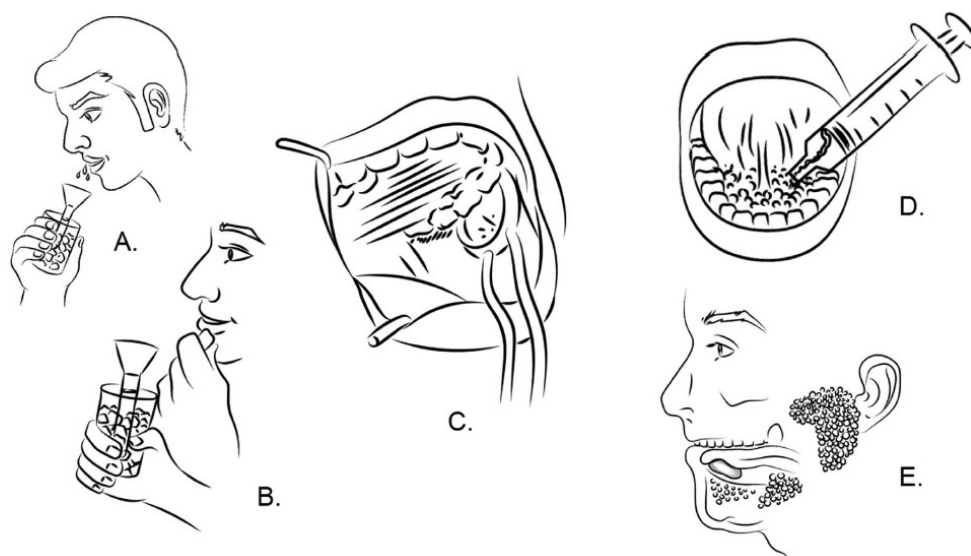


Figura 3 - Exemplos de diferentes métodos de recolha salivar: A) Saliva total não estimulada; B) Saliva total estimulada; C) Saliva da glândula parótida; D) Saliva da glândula sublingual não estimulada; E) Saliva da glândula sublingual estimulada (Fonte: Jasim et al., 2016)

1.1. Vantagens da saliva como meio de diagnóstico

Múltiplos constituintes da saliva têm a capacidade de refletir o estado de saúde ou de doença de um indivíduo (Y. H. Lee & Wong, 2009; Lima et al., 2010; A. Zhang et al., 2013). Este fluido tem sido estudado por investigadores de todo o mundo com o objetivo de o validar como um meio de diagnóstico que represente uma alternativa viável a meios mais invasivos e incómodos para a deteção de doenças. Sendo a colheita salivar um procedimento simples, rápido e não invasivo, a recolha de múltiplas amostras torna-se, assim, mais fácil, até porque pode ser executada por indivíduos sem qualificação exigida, ao contrário das colheitas de sangue, que requerem uma formação mais exigente. Tem baixo custo de recolha, de armazenamento e de transporte, o que se torna bastante útil quando aplicado a diagnósticos de grandes populações, permitindo a redução de despesas tanto para os doentes como para as entidades de saúde (Javaid et al., 2016; A. Wang, Wang, Tu, & Wong, 2016; Yoshizawa et al., 2013).

Este método é mais seguro quanto à colheita e manipulação da amostra, comparativamente a recolhas de sangue ou de urina, sendo mínimo o risco de infeção cruzada. A título de exemplo, a capacidade de infeção de HIV por transmissão oral é extremamente reduzida devido a alguns fatores existentes nas secreções salivares que inibem a infeção por este vírus (Gröschl, 2017; Pfaffe et al., 2011; Prasad, Tyagi, & Aggarwal, 2015; Yoshizawa et al., 2013).

Caso seja apresentada uma possibilidade de escolha aos doentes entre a recolha de uma amostra de saliva ou de sangue, a grande maioria opta pela saliva devido à ausência de dor, de desconforto ou de ansiedade durante a colheita. É, pois, um método ideal para indivíduos nos quais está dificultada a recolha de sangue, tais como crianças, idosos, doentes que sofram de ansiedade, deficiências ou que não sejam colaboradores (Madalli, Basavaraddi, Burde, & Horatti, 2013; Slowey, 2015).

1.2. Desvantagens da saliva como meio de diagnóstico

O facto de não existir um método de colheita *standard* para os diferentes estados patológicos é apontado como uma desvantagem do diagnóstico salivar. É, portanto, necessário que se defina um protocolo de modo a que a análise salivar traduza corretamente o funcionamento das

glândulas e que possa identificar, efetivamente, estados de saúde e de doença (Rahim, Abdul Rahim, Wan Ahmad, & Hashim, 2015).

A utilização da saliva tem, de facto, limitações capazes de dificultar ou impedir a realização de um diagnóstico correto. A existência de fatores que alterem a composição e/ou quantidade de saliva secretada pode, por vezes, comprometer os resultados da análise salivar (Lima et al., 2010; Pfaffe et al., 2011; Yoshizawa et al., 2013).

A estimulação do fluxo salivar vai, evidentemente, alterar o volume de amostra obtida durante o mesmo espaço de tempo. A recolha de saliva estimulada é um método vantajoso para doentes com hipossalivação (típica em idosos) por permitir a obtenção de um maior volume salivar em comparação com aquele que seria obtido caso fosse recolhida saliva não estimulada. Esta técnica aumenta a taxa de fluxo salivar e permite a obtenção de uma taxa de fluxo glandular constante durante múltiplas colheitas. No entanto, observa-se uma concentração mais diluída de biomarcadores na saliva estimulada, o que pode dificultar a detecção dos mesmos. Como tal, opta-se preferencialmente pela colheita de saliva não estimulada, visto que em geral não ocorrem grandes alterações quantitativas na maioria dos analitos presentes na saliva (Chiappin et al., 2007; Gröschl, 2017; Y. H. Lee & Wong, 2009; Malamud & Rodriguez-Chavez, 2011; Neyraud, Palicki, Schwartz, Nicklaus, & Feron, 2012; Pfaffe et al., 2011).

Durante o armazenamento e transporte de amostras salivares também existe o risco de contaminação bacteriana. Assim, é importante que as condições durante estes procedimentos sejam favoráveis a evitar que as amostras sofram alterações significativas. Para as preservar, a sua refrigeração deverá ser, idealmente, a uma temperatura entre -20°C e -80°C, sobretudo em casos de armazenamento de muitos meses. Alguns constituintes da saliva como a α -amilase, o conteúdo proteico total e os antioxidantes de baixo peso molecular mantêm a sua estabilidade até 2 semanas a -20°C; por sua vez, a concentração de cortisol sofre variações à temperatura ambiente durante 30 dias, o que já não se verifica se estiver conservada a -80°C até cerca de um ano (Nunes et al., 2015). Se as condições ideais não forem exequíveis, as amostras devem ser armazenadas previamente a 4°C, de modo a prevenir o crescimento bacteriano e a reduzir a degradação de várias moléculas (Gröschl, 2017; Whembolua, Granger, Singer, Kivlighan, & Marguin, 2006). Esta degradação também pode ocorrer devido às enzimas proteolíticas presentes na saliva, que quebram ligações peptídicas, pelo que a adição de substâncias

estabilizadoras e de inibidores de proteases é bastante importante (Chiappin et al., 2007; Madalli et al., 2013).

A concentração de vários componentes salivares varia consoante o ritmo circadiano, ou seja, a hora em que é feita a recolha, uma vez que os níveis salivares de moléculas como os péptidos aumentam ao longo do dia (Hardt et al., 2005; Neyraud et al., 2012).

A recolha da saliva em jejum é recomendada devido às variações que a ingestão de alimentos pode provocar na taxa de secreção salivar. Em particular, os alimentos e bebidas com alto teor de açúcar, acidez ou cafeína, além de estimularem a taxa de fluxo salivar, também diminuem o pH da cavidade oral, o que pode potenciar o crescimento bacteriano. Se não for possível a colheita em jejum, o que deve ser devidamente registado, a ingestão de alimentos e pastilhas elásticas deve ser evitada pelo menos 30 minutos antes. É ainda aconselhável que a limpeza da cavidade oral seja feita apenas com água, de preferência destilada, de modo a limitar a contribuição do FCG na amostra recolhida e a eliminar resíduos que possam comprometer a análise. Não deve ser efetuada qualquer escovagem com pasta dentária, independentemente do método de recolha salivar (Chiappin et al., 2007; Gröschl, 2017; Nunes et al., 2015; Yoshizawa et al., 2013).

A expressão de moléculas na saliva, tais como algumas proteínas, pode variar consoante o género e/ou a idade. Verifica-se uma concentração salivar mais elevada de algumas moléculas nas mulheres e, relativamente ao parâmetro idade, os níveis salivares de algumas proteínas aumentam e outros diminuem (Fleissig et al., 2010).

A secreção salivar pode ser afetada a curto ou longo prazo por algumas doenças sistémicas e outros fatores, que provocam alterações vasculares ou neurológicas, tais como a hipertensão, diabetes, depressão, desnutrição e desidratação. Os casos mais severos de diminuição da atividade das glândulas salivares podem dever-se a uma destruição gradual das mesmas pela presença de doenças como o síndrome de Sjögren e de tratamentos de radioterapia na cabeça e no pescoço que têm efeitos irreversíveis. Além disso, a secreção salivar pode ainda ser afetada por mais de 400 medicamentos atualmente prescritos (Pezelj-Ribaric et al., 2015).

As amostras recolhidas podem também sofrer contaminação sanguínea se ocorrer uma transferência de componentes do sangue para a saliva, através de inflamações na cavidade oral

causadas por lesões periodontais e da mucosa. As amostras contaminadas devem ser descartadas e deve ser efetuada uma nova recolha (Kivlighan et al., 2004; Rahim et al., 2015; Yoshizawa et al., 2013). É importante referir ainda que os níveis de determinados marcadores na saliva nem sempre traduzem verdadeiramente os níveis desses mesmos marcadores no sangue, uma vez que a maioria dos componentes têm geralmente concentrações mais elevadas na corrente sanguínea (Pfaffe et al., 2011). A estabilidade e integridade de algumas moléculas, com potencialidade de serem biomarcadores para diagnóstico, pode também ser comprometida pela possibilidade de degradação molecular durante os vários processos em que ocorre o transporte de alguns componentes do sangue para a saliva (Madalli et al., 2013).

A saliva como meio de diagnóstico apresenta algumas desvantagens acima descritas. Contudo, a sua utilização para deteção de doenças tem sido considerada uma alternativa válida, que apresenta vários benefícios (já mencionados), nomeadamente em comparação com a recolha de outros fluidos corporais e a possível interligação molecular da saliva com o sangue. É importante que sejam realizados múltiplos estudos, de modo a proporcionar uma avaliação molecular exaustiva de potenciais biomarcadores presentes no fluido oral que sejam característicos de uma ou mais doenças (A. Wang et al., 2016; Yoshizawa et al., 2013).

2. BIOMARCADORES E DIAGNÓSTICO SALIVAR

Em 1998, o *National Institutes of Health Biomarkers Definitions Working Group* definiu biomarcador como uma característica que pode ser medida de forma objetiva e que indica um estado biológico, de doença ou uma resposta a um tratamento aplicado (Prasad et al., 2015).

Mais recentemente, Baum, Yates, Srivastava, Wong, & Melvin (2011) definem este termo como: “alterações celulares, bioquímicas, moleculares ou genéticas, através das quais um processo normal ou anormal pode ser reconhecido ou monitorizado”. Esta definição é aceite e utilizada pelo *National Cancer Institute’s (NCI) Early Detection Research Network (EDRN)*, uma vez que existe grande variabilidade na aplicação deste termo e se torna desafiante esclarecer a abrangência deste conceito (Baum et al., 2011).

Uma espécie molecular pode ser considerada como um potencial biomarcador caso apresente capacidade de indicar um determinado estado ou resposta do organismo, a partir de uma

variação significativa da sua concentração, quando comparada a um grupo controlo (Majid & Shafi, 2014; Rahim et al., 2015; Wang et al., 2016).

A procura e identificação de biomarcadores nos vários fluidos corporais, que indiquem o estado de saúde de um indivíduo, é importante na deteção de doenças na sua fase inicial. Múltiplos componentes do sangue e da urina também podem ser detetados na saliva. O interesse pelos biomarcadores salivares deve-se à recolha simples e não invasiva da saliva e à riqueza do seu conteúdo molecular (Javaid et al., 2016; Y. H. Lee & Wong, 2009; Malamud & Rodriguez-Chavez, 2011; A. Zhang et al., 2013).

A saliva no diagnóstico, monitorização de doenças e avaliação da resposta do organismo a uma determinada terapêutica requer a existência de: biomarcadores discriminatórios, sólidos e validados em investigações clínicas, que reflitam um estado de saúde, de doença e/ou de resposta a tratamentos; um método não invasivo que detete esses biomarcadores; e tecnologias que os identifiquem (Taylor, 2014; A. Zhang et al., 2013).

O diagnóstico salivar é um processo que envolve a avaliação de biomarcadores específicos, individuais ou em combinação, capazes de detetar uma ou mais doenças. Um conjunto de biomarcadores com o objetivo de diagnosticar uma doença designa-se por “assinatura molecular”. É fundamental que o processo de identificação de biomarcadores salivares associados a uma doença seja rigoroso, isto é, deve ser realizada uma triagem adequada dos doentes a incluir nos estudos, uma recolha uniforme das amostras e múltiplos ensaios. Este processo inicia-se com a seleção de uma situação clínica na qual a saliva se pode revelar útil, assegurando o rigor da metodologia do estudo para aplicação clínica (A. Wang et al., 2016). O modelo PROBE (*prospective randomized open blinded end-point*) baseia-se em diretrizes específicas, de modo a obter um estudo não tendencioso, o que pode aumentar a probabilidade de sucesso da utilização de biomarcadores (Pepe, Feng, Janes, Bossuyt, & Potter, 2008). Após a seleção de uma situação clínica, segue-se a fase de recolha salivar. Ao contrário da colheita sanguínea, a recolha de saliva pode ser mais vantajosa e eficaz por não necessitar de punção venosa nem de tratamento anticoagulante para eliminação de glóbulos vermelhos, o que vai influenciar positivamente a probabilidade de sucesso do estudo. Finalmente, o processamento das amostras recolhidas para análise laboratorial deve assegurar a qualidade das mesmas para que se adequem aos trabalhos de investigação e validação a realizar. Para tal, é imprescindível a existência de fases de controlo de qualidade, de inventário e armazenamento, bem como a

documentação de todo o trabalho realizado. Na Tabela I, salientam-se alguns parâmetros clínicos que devem ser considerados durante as fases de recolha e processamento das amostras e que requerem uma aplicação uniforme na população em estudo, nomeadamente o estado de jejum ou não do sujeito, o período de tempo da recolha, o volume necessário da amostra, o método de recolha e o processamento e armazenamento da amostra (A. Wang et al., 2016).

Tabela I – Parâmetros clínicos que devem ser considerados durante a recolha e processamento de amostras salivares (Adaptado de A. Wang et al., 2016)

Parâmetro clínico	Descrição
Estado do sujeito	Deve ser prescrito ao sujeito um estado de jejum ou não, antes da recolha salivar. Estes estados podem influenciar a composição salivar.
Tempo de recolha salivar	Deve ser especificado um período de tempo concreto, durante a recolha, em que o doente pode contribuir com a sua saliva, para garantir que existe conteúdo biomarcador.
Volume necessário de amostra	Deve ser recolhido um volume de amostra específico para que seja possível a identificação de biomarcadores. Em doentes com condições que reduzam o fluxo salivar pode ser necessária a modificação do estudo, de modo a compensar esse volume reduzido.
Método de recolha	Deve ser documentado qual o método de recolha utilizado, pois este pode influenciar os resultados obtidos. Pode ser feita a recolha de saliva não estimulada ou de saliva estimulada (por uma pastilha de parafina, ácido cítrico ou rolos absorventes)
Processamento e armazenamento de amostra	A centrifugação deve ser considerada para eliminação de constituintes como as células epiteliais, cuja presença pode impedir a detecção das moléculas pretendidas. Pode ainda ser necessária a aplicação de agentes estabilizadores para a conservação das amostras recolhidas.

Ao ser validada uma relação entre biomarcadores salivares e determinadas doenças, é possível a deteção precoce das mesmas. Esta é primordial para reduzir a severidade de doenças, prevenir complicações que possam diminuir significativamente a qualidade de vida dos doentes, contribuindo ainda para o aumento da taxa de sucesso de tratamento (Baum et al., 2011; Javaid et al., 2016). Em doenças com elevado impacto global, como é o caso do cancro oral, foi possível concluir que os biomarcadores salivares apresentavam um maior benefício na deteção precoce desta doença do que biomarcadores plasmáticos (L. T. Lee et al., 2017). A deteção precoce revela-se bastante pertinente uma vez que muitas doenças são silenciosas e acabam por ser diagnosticadas tardiamente, já durante uma fase mórbida da doença. Tal ocorre porque

Relativamente às doenças que afetam a cavidade oral, é importante salientar que a incidência das doenças orais mais prevalentes, como o cancro oral, a cárie dentária e a doença periodontal,

tem vindo a aumentar nos últimos tempos pelo que se torna relevante a sua deteção precoce. Para tal, é necessário que o método de diagnóstico oral seja capaz de refletir o estado biológico do organismo de um indivíduo, permitindo estabelecer um diagnóstico diferencial, a localização da doença e a sua severidade (Majid & Shafi, 2014).

3. A SALIVA NAS DOENÇAS ORAIS

3.1. Cancro oral

O cancro oral é o sexto tipo de cancro mais comum, sendo que 90% destes casos são carcinomas orais de células escamosas (OSCC). Este é o cancro mais comum na região da cabeça e pescoço (Kaczor-Urbanowicz et al., 2017; Warnakulasuriya, 2009) e a sua taxa de sobrevida é, globalmente, de cerca de 40-50% aos 5 anos, tendo, por isso, um prognóstico reservado. A sua elevada morbilidade e mortalidade está relacionada com a sua capacidade invasiva local, bem como com o aparecimento de metástases regionais ou à distância, através de disseminação sanguínea e linfática (Pfaffe et al., 2011). A Figura 5 ilustra imagens de lesões suspeitas nas quais foram detetadas áreas diferenciadas em OSCC após realização de biópsia das mesmas (Messadi, 2013).

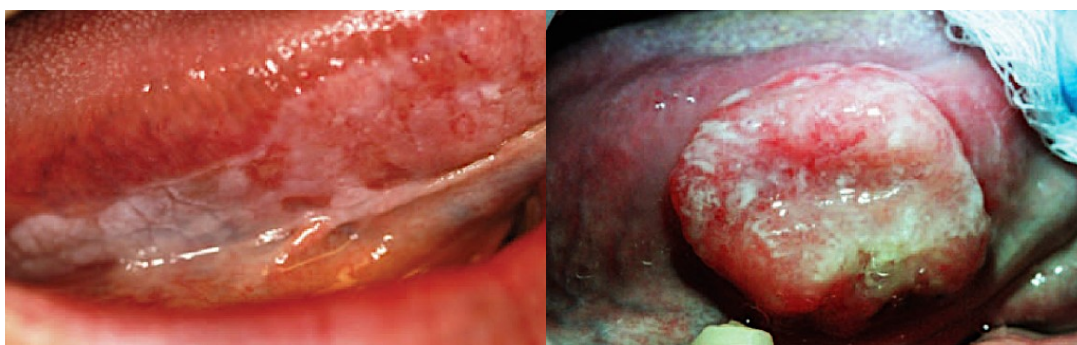


Figura 5 - Lesões suspeitas nas quais se detetou áreas com diferenciação de OSCC após biópsia
(Fonte: Messadi, 2013)

A sua incidência a nível mundial tem vindo a aumentar com o aparecimento de cerca de 500.000 novos casos todos os anos. Estes casos são observados, na sua grande maioria, numa fase tardia, sendo apenas detetados após o aparecimento de sintomas, apesar da fácil acessibilidade da cavidade oral ao exame objetivo. Contudo, nem sempre o exame visual e as análises histológicas apresentam sucesso na deteção precoce desta doença, dependendo muito

do examinador e da sua experiência neste tipo de patologia, juntando ao facto de as biópsias cirúrgicas serem desconfortáveis para os doentes e terem custos elevados. A deteção precoce continua a ser o fator que mais contribui para a sobrevida dos doentes. Estes factos contribuem para uma das mais baixas taxas de sobrevida do cancro oral (Csosz et al., 2017; Gleber-Netto et al., 2016; Messadi, 2013). Se o cancro for detetado numa fase inicial (estadio T1) a taxa de sobrevida é de cerca de 80% enquanto que, se for apenas detetado em fases mais avançadas (estádios T3 e T4), esta taxa diminui para 20-40% (Spielmann & Wong, 2011).

Em Portugal também se tem observado um aumento da prevalência desta doença, sendo que durante um período de 10 anos (1998-2007) foram detetados 9623 novos casos de cancro oral, do lábio e da orofaringe. Estes foram aumentando progressivamente ao longo dos anos, verificando-se 1200 casos de cancro oral e da faringe no ano de 2007 e, posteriormente, 1468 casos em 2008 (L. S. Monteiro, Antunes, Bento, & Warnakulasuriya, 2013). Em 2014, foi realizado um estudo em 128 doentes do Centro Hospitalar do Porto com OSCC e verificou-se a morte de 43,8% desses indivíduos devido ao facto de se encontrarem numa fase mais avançada da doença (L. Monteiro, Amaral, Vizcaino, Lopes, & Torres, 2014). A fase em que o cancro oral é detetado é um determinante fundamental na previsão da recorrência e na mortalidade dos doentes que sofrem desta doença. Se for possível detetar precocemente lesões pré-cancerígenas, como as displasias, e tratá-las antes de malignizarem, ou lesões cancerígenas, mas que se encontrem numa fase inicial, a taxa de sobrevida dos indivíduos com cancro oral pode melhorar significativamente. Assim, a prevenção do cancro oral e a redução da sua morbilidade e mortalidade passam pela deteção precoce e tratamento adequado, de acordo com a fase em que se encontra (Ho et al., 2012; Messadi, 2013; Messadi, Wilder-Smith, & Wolinsky, 2009; Nair, Pruthy, Pawar, & Chaturvedi, 2012).

O aparecimento desta doença está intimamente relacionado com fatores de risco como hábitos tabágicos e alcoólicos, má higiene e predisposição genética. Além destes, também o Vírus do Papiloma Humano (HPV), nomeadamente o HPV-16, tem sido reconhecido como uma das principais causas do desenvolvimento de carcinomas de células escamosas da cabeça e do pescoço, uma vez que cerca de 60% dos OSCC estão associados ao HPV-16. Logo, a presença deste vírus é considerada um biomarcador significativo para o OSCC. Atualmente existe um teste comercial, utilizado nos Estados Unidos e no Canadá, designado por OraRisk® HPV dos laboratórios Oral DNA® Labs, que deteta a presença de HPV-16, identificando os indivíduos com potencial risco para desenvolver cancro oral. Este teste consiste na execução de um

bochecho com uma solução salina durante 30 segundos e posterior colheita da amostra para avaliação (Javaid et al., 2016; Marur, D'Souza, Westra, & Forastiere, 2010). A Figura 6 representa o kit salivar do teste comercial anteriormente descrito para a detecção da presença de HPV-16 associada ao OSCC (Javaid et al., 2016).



Figura 6 - Kit salivar para a detecção da presença de HPV-16 associada ao OSCC (Fonte: Javaid et al., 2016)

Os tecidos das lesões pré-malignas e malignas típicas do cancro oral estão em contato íntimo com a saliva, pelo que, sendo esta o fluido presente na cavidade oral, a sua análise pode refletir características específicas desta doença (Vajaria et al., 2013).

As células cancerígenas resultam da proliferação anormal de células com DNA danificado que não são eliminadas pela morte celular programada, isto é, a apoptose. O controlo dos mecanismos de proliferação celular e de apoptose é da responsabilidade de proteínas supressoras de tumores, como a proteína p53. Esta proteína é produzida justamente em resposta à presença de DNA danificado dentro de uma célula. Caso esta proteína sofra mutações, que tenham como consequência a sua inativação, podem desenvolver-se vários tipos de cancro no organismo, incluindo o OSCC. As mutações da p53 são a principal causa de desenvolvimento de tumores. A p53 tem um tempo de semivida prolongado, o que leva à acumulação da sua forma inativa na célula danificada, tendo-se verificado, num estudo de Agha-Hosseini, Mirzaii-Dizgah & Miri-Zarandi (2015), que a concentração salivar de p53 em indivíduos com OSCC (confirmado por exames clínicos e histopatológicos) era significativamente mais elevada que no grupo de controlo. Para além disso, a presença elevada de p53 na saliva de indivíduos com OSCC resulta na produção de anticorpos contra esta proteína, que têm sido detetados no sangue

e na saliva de doentes portadores de cancro (Deepa & Thirrunavukkarasu, 2010; Farnaud, Kosti, Getting, & Renshaw, 2010; Malathi, Mythili, & Vasanthi, 2014).

Na presença de cancros da cabeça e do pescoço, a produção de citocinas e quimiocinas (pequeno grupo de citocinas) por células tumorais e linfócitos pode estar aumentada, em resposta à disfunção imunitária e inflamação locais (Chang et al., 2011; Pries & Wollenberg, 2006). As citocinas têm função na regulação do crescimento e proliferação celular, reparação tecidual, angiogénese e em respostas imunitárias do organismo. Por sua vez, considera-se que as quimiocinas têm um efeito indireto sobre a angiogénese e que são capazes de afetar a transformação celular diretamente, potenciando o crescimento tumoral (Kamatani et al., 2013; Vicari & Caux, 2002). Assim, é provável que estas moléculas possam constituir biomarcadores salivares desta doença. L. T. Lee et al. (2017) avaliaram o potencial individual de 14 moléculas pertencentes aos grupos de citocinas e quimiocinas para o diagnóstico de OSCC numa população de 65 indivíduos: 24 no grupo de controlo, 22 no grupo com OSCC nos estadios I-II (OSCC I-II) e 19 no grupo com OSCC nos estadios III-IV (OSCC III-IV). Foram avaliados os níveis salivares e plasmáticos destes biomarcadores nos diferentes grupos, bem como qual dos fluidos apresentava melhor capacidade na detecção de OSCC em fases iniciais. Entre os grupos de controlo e de OSCC I-II, 7 das 14 moléculas em estudo apresentaram concentrações salivares significativamente mais elevadas em doentes com esta doença: IL-1 β , IL-6, IL-8, TNF- α , IFN- γ , MIP-1 β e eotaxina. Estes resultados devem-se provavelmente à ação pró-inflamatória e pró-angiogénica das mesmas, característica do crescimento e progressão tumoral. Apenas 1 molécula demonstrou concentrações plasmáticas mais elevadas no grupo de OSCC I-II, a IP-10. Pensa-se que esta é secretada, na sua maioria, por células tumorais, apresentando potencialidade como biomarcador da progressão de tumores (Kamatani et al., 2013; Vicari & Caux, 2002). Entre os grupos OSCC I-II e OSCC III-IV, somente a concentração salivar de 1 molécula foi significativamente diferente, enquanto que as concentrações plasmáticas diferiram em 5 moléculas. Perante estes resultados, os autores inferiram que a utilização de biomarcadores salivares é mais vantajosa e adequada para a detecção precoce de OSCC. Em contraste, os biomarcadores plasmáticos apresentam concentrações mais elevadas em fases avançadas de OSCC, quando já estão presentes metástases. Ao invés, nesses estadios, a secreção salivar poderá estar afetada devido ao tratamento de radioterapia, com a consequente dificuldade de valorização de biomarcadores (L. T. Lee et al., 2017).

O OSCC resulta de múltiplas alterações genéticas interdependentes, nomeadamente mutações, pelo que esta doença envolve um número elevado de genes e de modificações na sua expressão e tradução proteica. Assim, a combinação de várias moléculas, neste caso de proteínas, em alternativa à análise individual das mesmas, pode ser vantajosa e possibilitar melhorias na sensibilidade (capacidade de identificar os indivíduos portadores de uma doença) e especificidade (capacidade de identificar os indivíduos não portadores de uma doença) na detecção desta doença. Como tal, o método de combinação de biomarcadores proteicos no diagnóstico tem sido explorado nos últimos anos (Hu et al., 2008; Lippman, Sudbø, & Hong, 2005). Um estudo envolveu a recolha salivar de doentes com OSCC e de um grupo controlo com o objetivo de analisar o conteúdo proteico total das amostras e identificar proteínas salivares com expressão aumentada em casos de OSCC. Após várias análises, 12 proteínas salivares mostraram diferenças elevadas na sua concentração entre o grupo com OSCC e o grupo controlo. Estas proteínas foram submetidas a uma nova validação, obtendo-se os melhores resultados na combinação de 5 delas: M2BP, MRP14, CD59, catalase e profilina (Hu et al., 2008). A M2BP é um antigénio tumoral envolvido no cancro e na sua metastização (Park et al., 2007); a MRP14, expressada pelos granulócitos, pertence à família de proteínas transportadoras de cálcio e está envolvida na regulação da transcrição e tradução proteica e na atividade antibacteriana, antifúngica e antitumoral, tendo sido detetada previamente em células de cancro da língua (He, Chen, Kung, Po-Wing Yuen, & Chiu, 2004); a CD59 é um dos fatores de restrição do complemento que permitem a sobrevivência de células tumorais à morte dependente do complemento e mediada por anticorpos (Ravindranath & Shuler, 2007); a catalase é uma enzima antioxidante que atua na proteção das células contra o stress oxidativo, cuja alteração dos seus níveis normais relaciona-se com a carcinogénese e a progressão tumoral (McEligot, Yang, & Meyskens, Jr., 2005); e a profilina é uma proteína, reguladora do sistema do microfilamento que pode ser secretada em fases iniciais de progressão tumoral (Huang et al., 2006). A combinação destas proteínas apresentou uma sensibilidade de 90%, especificidade de 83% e exatidão (proximidade de um valor medido ao valor real) total de cerca de 85% para a deteção de OSCC (Hu et al., 2008).

A presença de cancro, incluindo de OSCC, altera processos que ocorrem no interior das células tais como a transcrição genética, a tradução proteica e os mecanismos pós-traducionais, modificando também produtos finais do metabolismo das moléculas envolvidas, ou seja, os metabolitos (Rhee & Gerszten, 2012). Num estudo de Sugimoto, Wong, Hirayama, Soga, &

Tomita (2010) foram identificados 4 metabolitos salivares (colina, betaína, ácido pipecólico e L-carnitina) como potenciais biomarcadores para a deteção de OSCC, devido aos resultados significativamente distintos entre o grupo portador da doença e o grupo de controlo (Sugimoto et al., 2010). Posteriormente, Q. Wang et al. (2014) investigaram a combinação destes 4 metabolitos, identificando uma variação significativa nas concentrações salivares destes metabolitos entre doentes saudáveis e doentes com OSCC nos estadios I-II. Os metabolitos colina, betaína e ácido pipecólico apresentaram concentrações superiores em doentes com OSCC, enquanto que no caso da L-carnitina foi observada uma redução. Na presença de cancro e na sua proliferação, o principal meio de fosforilação é o metabolismo da colina. Assim, a conversão deste nutriente, que provém essencialmente da dieta, em fosfatidilcolina é necessária para a síntese das membranas celulares, a qual está aumentada em células tumorais. Sendo a betaína um dos produtos de oxidação da colina, a sua concentração salivar também está elevada. Os altos níveis salivares do ácido pipecólico podem ser compreendidos pelo facto de ser um produto intermediário do catabolismo do aminoácido lisina, que se encontra aumentado em células de OSCC. Por sua vez, os reduzidos níveis de L-carnitina, fundamental para o transporte dos ácidos gordos para as mitocôndrias das células musculares, são justificados pela desregulação do metabolismo dos ácidos gordos na doença oncológica oral (Katz-Brull, Margalit, & Degani, 2001; Q. Wang et al., 2014). Os resultados deste estudo evidenciaram uma adequada capacidade de distinção entre o grupo controlo e o grupo de doentes com OSCC nos estadios I-II, apresentando uma sensibilidade de 100% e especificidade de 96,7%. Contudo, os autores consideram a necessidade de estudos mais abrangentes que permitam a validação destes biomarcadores (Q. Wang et al., 2014).

As alterações histopatológicas características do cancro oral podem ser inicialmente observadas em doenças orais potencialmente malignas (DOPM). Caso estas sejam detetadas numa fase inicial, antes de malignizarem, é possível intervir precocemente com o tratamento adequado. Consequentemente, é possível aumentar a taxa de sobrevida e diminuir as sequelas causadas por esta doença e pelas terapêuticas agressivas em fases avançadas. Estas lesões são normalmente detetadas no exame visual, apesar de, frequentemente, ser difícil a distinção de DOPM e de lesões sem risco de malignização. Torna-se assim importante o desenvolvimento de um método fidedigno que permita estabelecer a diferenciação entre os dois tipos de lesões (Gleber-Netto et al., 2016; Napier & Speight, 2008). Gleber-Netto et al. (2016) estudaram, a nível de biomarcadores salivares, diferenças entre um grupo com OSCC e outros dois grupos, um de controlo e outro caracterizado por DOPM. Este estudo avaliou 7 moléculas de RNA: IL-

8, IL-1 β , SAT1, OAZ1, DUSP1, S100P, H3F3A; e as citocinas, IL-8 (IL-8p) e IL-1 β (IL-1 β p) (Gleber-Netto et al., 2016). Como já foi referido anteriormente, as citocinas têm função na regulação do crescimento e proliferação celular, reparação tecidual, angiogénese e em respostas imunitárias do organismo (Kamatani et al., 2013; Vicari & Caux, 2002). As funções das moléculas de RNA em estudo e a sua importância para o cancro oral estão apresentadas na Tabela II (Li et al., 2004).

Tabela II - Características de mRNAs com concentrações salivares aumentadas em doentes com OSCC (Adaptado de Li et al., 2004)

mRNA	Funções	Relevância para o estudo da sua associação com o cancro oral
IL-8	Angiogénese; replicação; via de sinalização mediada por cálcio; adesão celular; quimiotaxia; checkpoints do ciclo celular; resposta imunitária	Concentrações elevadas em casos de cancro oral
IL-1β	Transdução de sinal; proliferação; inflamação; apoptose	Concentrações elevadas em casos de cancro oral
SAT1	Enzima; atividade da transferase	Concentrações elevadas em diferentes cancros
OAZ1	Biossíntese de poliaminas	Previsto como supressor de tumor pelo carácter inibitório da ornitina descarboxilase
DUSP1	Modificação proteica; transdução de sinal; stress oxidativo	Implicado como mediador da via de sinalização do supressor tumoral PTEN (<i>Phosphatase and tensin homolog</i>)
S100P	Ligação proteica; ligação ao ião cálcio	Associado à progressão ou fases precoces de diferentes cancros
H3F3A	Atividade de ligação ao DNA	Concentrações elevadas em diferentes cancros

Foi recolhida saliva não estimulada de uma amostra de 180 indivíduos (60 no grupo controlo, 60 com OSCC e 60 com DOPM). No caso dos biomarcadores de RNA, DUSP1 apresentou uma concentração salivar mais reduzida nos doentes com OSCC do que nos grupos controlo e DOPM, provavelmente devido à sua função de mediador da via de sinalização do supressor tumoral PTEN, que tem sido encontrado com mutações em vários tipos de cancro (Unoki & Nakamura, 2001). Relativamente às proteínas avaliadas, os níveis salivares de IL-8p foram

significativamente mais elevados que os do grupo de controlo e de DOPM. A performance deste biomarcador, isoladamente, foi considerada a melhor em comparação com qualquer outro, evidenciando o melhor desempenho dos biomarcadores proteicos em relação aos de RNA. A concentração salivar de IL-1 β p também apresentou resultados superiores no grupo OSCC em comparação com os outros dois. As concentrações salivares elevadas das proteínas IL-1 β e IL-8 podem ser justificadas pelo facto destas citocinas serem produzidas por células do sistema imunitário em resposta à presença do OSCC ou mesmo pelas próprias células tumorais (Pries & Wollenberg, 2006). Verificou-se que a combinação destas duas categorias de moléculas era benéfica, uma vez que a concentração de IL-8p e de IL-1 β mRNA apresentavam o melhor valor discriminatório entre doentes com OSCC e o grupo controlo enquanto que, a combinação de IL-8p e H3F3A mRNA possibilitou uma distinção eficaz entre doentes com OSCC e DOPM. Os valores elevados de H3F3A mRNA podem ser explicados pelo facto desta molécula constituir um biomarcador proliferativo, aumentado em alguns tipos de cancro (Bettuzzi et al., 2000). Este estudo permitiu concluir que a combinação de moléculas diferentes como proteínas e RNAs é vantajosa na distinção de indivíduos saudáveis e com OSCC. Os autores demonstraram ainda, pela primeira vez, que os analitos salivares poderão ser capazes de diagnosticar situações potencialmente malignas, o que pode auxiliar na detecção precoce de doentes em risco de desenvolver OSCC (Gleber-Netto et al., 2016).

Tal como já foi referido, o cancro oral resulta de múltiplas modificações complexas no organismo pelo que o número de moléculas que têm sido estudadas como biomarcadores salivares para esta doença e para potenciais estados pré-cancerígenos é elevadíssimo. Mais de 120 potenciais biomarcadores salivares para esta doença têm sido estudados em mais de 100 estudos publicados desde 1992 até aos dias de hoje. Numa revisão foram analisados 270 artigos, dos quais foram seleccionados 48, tendo sido eliminados aqueles que não se encontravam publicados em Inglês, os artigos de revisão, os relatórios de casos, as notícias e as cartas a editores. Foram também excluídos os artigos referentes a estudos não-humanos, a estudos com ausência de grupo de controlo e a estudos sem uma metodologia devidamente descrita e clarificada. A Figura 7 representa a metodologia anteriormente descrita para a seleção e inclusão dos artigos nesta revisão (Kaur, Jacobs, Huang, Salvo, & Politis, 2018).

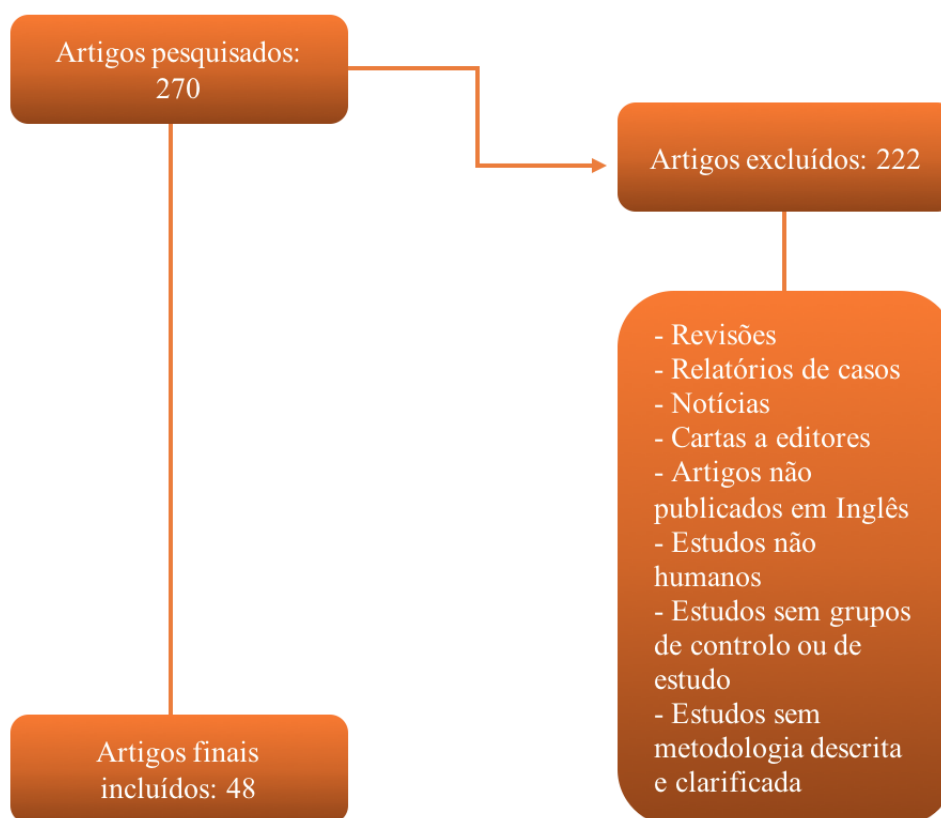


Figura 7 - Metodologia para a seleção e inclusão dos artigos da revisão de J. Kaur et al. (2018) (Adaptado de: J. Kaur et al. 2018)

Os principais obstáculos apontados pelos autores relativamente ao diagnóstico salivar foram: a falta de standardização de métodos de recolha, processamento e análise salivar; a variabilidade de concentrações de potenciais biomarcadores em doentes com e sem cancro; e a validação de biomarcadores salivares. A resolução destes problemas poderá tornar o diagnóstico salivar fidedigno. Os autores salientam ainda a importância da combinação de biomarcadores que, associada à padronização do tratamento da amostra salivar, poderá apresentar resultados eficazes na deteção precoce e diagnóstico preciso. A Tabela III representa a variedade de tipos de biomarcadores salivares estudados nos artigos finais selecionados nesta revisão e respetivos resultados desses estudos. Nos diferentes tipos de moléculas com resultados promissores para a detecção do cancro oral incluem-se proteínas, DNA, RNA,

mRNA, MicroRNAs, RNAs longos não codificados, moléculas oxidativas, glucocorticóides e metabolitos (J. Kaur et al., 2018).

Tabela III - Biomarcadores salivares para a detecção do cancro oral (Adaptado de J. Kaur et al., 2018).

Tipo de biomarcador	Biomarcadores salivares detetados no cancro oral em diferentes estudos	Resultados
Proteínas	Anexina 1 e peroxirredoxina 2	Presentes apenas em doentes com cancro oral
	K-10	Casos de leucoplasia oral
	IL-8	Concentrações maiores em casos com cancro oral do que no grupo controlo
	Tetranectina	Subexpressão em casos de OSCC metastático
	TNF- α , IL-6	Concentrações de IL-6 significativamente maiores em casos de cancro oral do que grupos controlo e pré-cancerígeno
	IL-8, IL-1 β , DUSP1, HA3, OAZ1, S100P, SAT	Concentrações elevadas em casos de cancro oral
	IL-8, IL-1 β	Concentrações significativamente maiores em casos de OSCC
	IL-6	Concentrações maiores em casos de leucoplasia oral e de cancro oral
	CA-125	Concentrações maiores em casos de cancro oral do que no grupo controlo
	CA-50, CEA	Concentrações significativamente maiores em tumores malignos
	MMP-1, MMP-10, MMP-12, MMP-3	Concentrações maiores de MMP-1 e MMP-3 em casos de OSCC
	Quemerina e MMP-9	Capacidade elevada de distinção entre OSCC e lesões pré-cancerígenas
	Cistatina SA-1	Expressão de parte da proteína em casos de cancro oral
	Transferrina	Concentrações maiores em casos de cancro oral
	ALDH	Atividade maior em casos de OSCC
DNA	Adenosina Deaminase	Concentrações maiores no carcinoma da língua

	ECAD, TMEFF2, MGMT	Sensibilidade e especificidade elevadas para detecção de cancro oral; Sensibilidade 100% e Especificidade 87,5% na combinação de ECAD, TMEFF2, RARβ e MGMT
mRNAs	RNA, SAT, OAZ1, H3F3A	Concentrações significativamente maiores em casos de cancro oral
MicroRNAs	MicroRNA 125a, Micro-200a	Concentrações significativamente menores em casos de OSCC
	MiR-31	Significativamente maior em casos de cancro oral do que grupo controlo
RNAs longos não codificados	lncRNA	Quantidade detectável na saliva total
Oxidativo	Moléculas relacionadas com o stress oxidativo: peroxidase lipídica, radicais hidroxilo, superóxido dismutase	Concentrações maiores de radicais hidroxilo e de hidrogénio em casos de OSCC
Glucocorticóides	Cortisol	Concentrações maiores em casos de carcinomas orofaríngeos de células escamosas
Metabolitos	Nicotinamida	Desregulação da nicotinamida N-metiltransferase
Outros	Telomerase	Expressão de atividade
	Células apoptóticas	Quantidade menor em casos de OSCC do que grupo controlo
Combinação de biomarcadores	mRNAs: DUSP1, GADD45B, H3F3A, IL-1 β , IL-8, OAZ1, RGS2, S100P e SAT	Concentrações maiores em casos de OSCC; Sensibilidade 90,6% na combinação de IL-8, SAT e H3F3A
	Actina e miosina salivares	Distinção de lesões cancerígenas e pré-cancerígenas Actina: Sensibilidade 100% e Especificidade 75%; Miosina: Sensibilidade 67% e Especificidade 83%
	mRNAs: IL-1 β , IL-8, OAZ e mRNAs SAT	Boa probabilidade de previsão (80%) em casos de OSCC

3.2. Cárie dentária

A cárie dentária é a doença de etiologia microbiana mais prevalente, apesar de existirem vários métodos de prevenção da mesma. A sua incidência mundial é de cerca de 40% em crianças e 90% em adultos. A demanda de fatores que sejam capazes de identificar indivíduos com alto risco de cárie tem vindo a aumentar, de modo a aplicar métodos preventivos e tratamentos mais eficazes e adequados (Beltrán-Aguilar et al., 2005; Zhao, Blackburn, Chin, & Srinivasan, 2014). Na Figura 8, é possível visualizar o aspeto clínico de lesões de cárie avançadas (S. Kaur, Kaur, Rai, & Khajuria, 2015).



Figura 8 - Cárie dentária (Fonte: S. Kaur et al., 2015)

A saliva apresenta várias características protetoras do meio oral, tais como a capacidade tampão, a ação antimicrobiana e a capacidade de controlar o equilíbrio desmineralização/remineralização, fundamentais para evitar o aparecimento e progressão de lesões dentárias. Estas lesões podem levar a alterações na composição salivar. A cárie é uma doença oral causada por agentes bacterianos que, juntamente com o consumo excessivo de hidratos de carbono fermentáveis provenientes da dieta alimentar, que aumentam a produção de ácido, com diminuição do pH da cavidade oral. Por sua vez, a maior acidez do meio oral leva a uma maior proliferação deste tipo de bactérias, com a consequente ainda maior e mais rápida produção de ácido. Este danifica as superfícies dentárias, resultando na cavitação das mesmas e na alteração da composição salivar. O desenvolvimento de lesões de cárie depende desta inter-relação que se estabelece entre a dieta e os microrganismos, bem como da predisposição inerente ao indivíduo. (Gao, Jiang, Koh, & Hsu, 2016; Malamud, D., &

Rodriguez-Chavez, 2011; Zhao et al., 2014). A detecção deste tipo de lesões é feita maioritariamente por exame visual direto e radiográfico. Existem ainda testes complementares como a análise salivar, que permitem a identificação de alguns agentes bacterianos característicos da doença cárie, nomeadamente o teste comercial CRT Bacteria®, muito utilizado atualmente. Este permite a contagem de *Streptococcus mutans* e de *Lactobacillus*, que poderão ser possíveis biomarcadores. Vários estudos têm demonstrado uma associação entre a elevada quantidade destas bactérias e a prevalência aumentada de lesões de cárie. Os *Streptococcus mutans* parecem estar relacionados efetivamente com o início das lesões de cárie, existindo uma associação significativamente elevada entre o número de cáries e a presença acrescida destas bactérias na saliva. Relativamente aos *Lactobacillus*, os dados são menos conclusivos, considerando-se que provavelmente não estão relacionados com o início da cavitação dentária, mas sim com a progressão de lesões já instaladas, apresentando uma correlação elevada com o consumo excessivo de açúcares (Gao et al., 2016; Malathi et al., 2014; Silla & Company, 2013). Estas duas espécies de bactérias são consideradas as mais fortemente relacionadas com a cárie dentária. Ainda assim, vários estudos detetaram a presença de outros microrganismos que podem estar associados com esta doença tais como *Streptococcus salivarius*, *Streptococcus sobrinus*, *Streptococcus sanguinis*, *Actinomyces spp*, *Veillonella* e *Candida albicans*. Contudo, são necessários mais estudos que validem esta associação uma vez que a evidência da relação destas espécies com as lesões de cárie não é tão significativa como nos *Streptococcus mutans* e *Lactobacillus* (Gao et al., 2016; Rathnayake et al., 2017). Por outro lado, um estudo de Belstrøm et al. (2017), observou que, nos perfis bacterianos da saliva de indivíduos com baixa incidência de cáries, havia uma maior abundância de espécies que fermentam de modo ligeiro os açúcares: *Neisseria*, *Haemophilus* e *Fusobacterium* (Belstrøm et al., 2017).

As bactérias responsáveis pela cárie dentária colonizam a cavidade oral e, consequentemente, originam processos inflamatórios neste meio, que vão suscitar respostas do sistema imunitário do organismo. As células imunitárias libertam então quimiocinas como a IL-8 e citocinas como a IL-6 e TNF- α . Num estudo de 2012, recolheu-se saliva não estimulada de um grupo de doentes com cáries dentárias e de um grupo controlo saudável, com o objetivo de comparar os níveis salivares de IL-8, IL-6 e TNF- α . Verificou-se que estes eram significativamente mais elevados em doentes com cáries, permitindo aos autores concluir que existia uma relação entre esta doença e a produção de algumas citocinas e quimiocinas, cujo doseamento poderia ser

útil no diagnóstico e monitorização da cárie dentária. Este estudo foi, no entanto, realizado numa população reduzida, pelo que os autores referem a necessidade de investigações subsequentes (Gornowicz et al., 2012).

Os odontoblastos, localizados à superfície da polpa dentária, são capazes de detetar agentes patogénicos e respetivos produtos libertados, estimulando uma resposta imunitária do organismo. Essa deteção é possível através de moléculas expressadas pelos odontoblastos, tais como os recetores tipo Toll (TLR), que reconhecem padrões patogénicos específicos. A sua ação consiste em desencadear respostas que permitam prevenir e controlar infeções, criando uma barreira que analise constantemente o meio oral. Os TLR funcionam de modo individual ou em conjunto com co-recetores, como o CD14. A sua associação com o TLR-2 tem capacidade de detetar peptidoglicanos de bactérias Gram-positivas, mais predominantes na cárie dentária; e associada ao TLR-4 reconhece lipopolissacarídeos de bactérias Gram-negativas. O TLR-2 é também capaz de identificar o ácido lipoteicóico, libertado pelas bactérias mais fortemente associadas à cárie, os *Streptococcus mutans*. A presença de ácido lipoteicóico estimula um aumento da expressão de TLR-2 pelos odontoblastos (Farges et al., 2011). Como tal, Zhao et al. (2014), consideraram a hipótese de os níveis salivares de TLR-2 e CD14 estarem associados à cárie dentária e da sua potencialidade como biomarcadores. O estudo destes autores envolveu 40 crianças entre os 6-12 anos, 20 com cáries ativas e 20 sem lesões de cárie. Apesar dos valores salivares de CD14 terem sido considerados ambíguos nos dois grupos, a concentração salivar de TLR-2 foi significativamente mais elevada em doentes com cáries em atividade, em comparação com os doentes sem cáries. Os autores afirmam que os níveis de TLR-2 na saliva poderão representar um biomarcador para a atividade de lesões de cárie, contudo, recomendam a realização de mais estudos que validem esta relação (Zhao et al., 2014).

Durante o desenvolvimento de uma lesão cariosa, a quantidade de radicais livres produzidos parece estar relacionada com a atividade da mesma e o excesso dos mesmos no organismo pode ser prejudicial. Estas moléculas são caracterizadas pela sua instabilidade química, uma vez que têm pelo menos um eletrão não emparelhado e, conseqüentemente, têm tendência a reagir rapidamente com outros compostos de modo a capturar um eletrão dos mesmos. Deste modo, os radicais livres são neutralizados, processo que pode ser concretizado por enzimas como a superóxido dismutase, que atua como antioxidante e como um mecanismo de defesa contra os radicais livres, reduzindo a sua quantidade no organismo. Esta enzima tem cofatores como o

cobre e o zinco (Bödör, Matolcsy, & Bernáth, 2007; Tulunoglu, Demirtas, & Tulunoglu, 2006). Um estudo que decorreu de Dezembro de 2010 a Junho de 2011 e que incluiu 60 doentes com lesões de cárie ativa e 20 doentes sem evidência de cárie, teve como objetivo avaliar a atividade da enzima superóxido dismutase e os níveis de cobre e zinco na saliva dos doentes destes dois grupos. Foram recolhidas amostras de saliva estimulada (com pastilhas de parafina) de cada doente. Após a análise salivar, verificou-se um aumento da capacidade antioxidante no grupo com cáries em atividade uma vez que este apresentava níveis mais elevados destes três componentes do que o grupo do controlo, sendo que os valores obtidos foram considerados estatisticamente significativos e em concordância com estudos anteriores (Hegde, Hegde, Ashok, & Shetty, 2014).

A proteção da cavidade oral, nomeadamente das superfícies dentárias, contra a atividade de microrganismos é conseguida pela saliva e alguns dos seus constituintes tais com as mucinas secretadas pelas glândulas salivares, que apresentam uma função de barreira. As MUC5B e MUC7 são as duas principais populações de mucinas secretadas, sendo consideradas a primeira linha de defesa para os tecidos epiteliais. As glândulas salivares e células epiteliais da cavidade oral expressam uma outra mucina ligada à membrana, designada de MUC1, a qual se pensa que também contribui para a proteção do epitélio contra agentes patogénicos, atuando como uma segunda linha de defesa. Como tal, poderá haver alteração dos níveis de secreção de expressão destas mucinas na saliva, na presença de fenómenos inflamatórios (Offner & Troxler, 2000). Assim, foi realizado um estudo com o objetivo de comparar os níveis salivares de MUC5B, MUC7 e MUC1 em jovens com lesões de cárie. A população estudada consistiu num grupo de adolescentes com 18 anos: 27 indivíduos com elevado índice de cárie e 8 com baixo (avaliados pelo índice CAO: cariados/ausentes/obturados), que foram submetidos a uma recolha de saliva não estimulada. Após análise das amostras, verificou-se que apenas os níveis de salivares de MUC1 foram significativamente superiores no grupo com elevado índice de cárie, observando-se uma correlação positiva entre os mesmos. Os autores propõem uma possível relação entre as concentrações salivar de mucinas e a cárie dentária, referindo, no entanto, a necessidade de mais estudos e em amostras mais consideráveis (Gabryel-Porowska et al., 2014).

A ação protetora da saliva é possibilitada ainda pela presença na sua composição de eletrólitos como o flúor, cálcio, fosfato, que contribuem para a manutenção da integridade das peças dentárias, e o bicarbonato, responsável pela capacidade tampão contra os ácidos resultantes da

fermentação dos hidratos de carbono. Estes eletrólitos podem constituir potenciais biomarcadores salivares da doença cárie, sendo que em algumas investigações foi possível estabelecer uma relação entre a sua baixa concentração salivar e cáries em atividade. Todavia existem também estudos que não mostram evidência desta associação pelo que é importante que a sua investigação prossiga (Gao et al., 2016; García-Godoy & Hicks, 2008; Pan & Darvell, 2007). O conteúdo proteico da saliva é constituído por cerca de 5-15% de imunoglobulinas, também possuindo uma ação antibacteriana, caracterizada pela inibição do metabolismo e da adesão de agentes bacterianos à superfície dentária. Apesar de existirem vários estudos com o objetivo de estabelecer uma relação entre estas imunoglobulinas e a presença de cáries, a literatura encontra-se igualmente dividida pelo que ainda não foi possível obter conclusões. Revela-se importante ultrapassar certas limitações destes estudos, tais como o número reduzido de amostras, a diversidade das populações com diferentes níveis de incidência de cárie e a variabilidade de condições de recolha e análise salivar (Gao et al., 2016; Van Nieuw Amerongen, Bolscher, & Veerman, 2004).

A saliva pode ainda sofrer variações no seu fluxo, pH e capacidade tampão (neutralização de ácidos). A alteração destas propriedades pode contribuir para uma maior susceptibilidade no desenvolvimento de lesões de cárie, servindo também como eventuais biomarcadores para o risco de cárie de um indivíduo. A hipossalivação, ou seja, um fluxo salivar inferior a 0,7ml/min após estimulação da saliva com uma pastilha de parafina durante 5 minutos, é motivo de alerta, assim como uma baixa capacidade tampão, que pode ser medida com o teste comercial CRT Buffer®. Existem estudos contraditórios relativamente a alguns destes parâmetros pelo que se deve dar uma continuidade à investigação da sua relação com esta doença (Gao et al., 2016; Rathnayake et al., 2017; Silla & Company, 2013). Embora as alterações relativas à quantidade e composição salivar possam apresentar potencial para identificar e monitorizar lesões de cárie, nenhum dos testes salivares estudados é capaz de o fazer individualmente. É indispensável a combinação de vários métodos que permitam inferir exatamente o risco de cárie de um determinado indivíduo (Javaid et al., 2016; Tellez, Gomez, Pretty, Ellwood, & Ismail, 2013).

O risco de cárie relaciona-se essencialmente com um ou mais dos seguintes fatores: o desequilíbrio imunitário, a tendência de adesão de agentes cariogénicos e a baixa capacidade tampão da saliva (Jenkinson & Lamont, 2005; Loke, Lee, Sander, Mei, & Farella, 2016; Tao et al., 2005). Mira, Artacho, Camelo-Castillo, Garcia-Esteban, & Simon-Soro (2017) propuseram um teste salivar de previsão do risco de cárie denominado *Salivary Immune and*

Metabolic Marker Analysis (SIMMA), com o objetivo de, não só identificar o risco de cárie de um indivíduo, mas também determinar a origem biológica do mesmo risco. Na determinação desse risco devem ser estudadas moléculas relacionadas com cada um dos fatores apresentados, sendo que os autores consideraram que deveriam existir pelo menos 2 variáveis em cada um deles. Devido às alterações que estas moléculas salivares podem sofrer pela influência de fatores como o método e hora de recolha da saliva e a estimulação ou não do fluxo salivar, é importante estabelecer um único protocolo com uma hora de colheita definida, eliminando o efeito da variação circadiana na composição salivar. Os valores obtidos devem ser comparados aos de uma população saudável da mesma faixa etária. Deste modo, conhecendo a causa do elevado risco de cárie de um indivíduo, é possível aplicar terapêuticas específicas e determinar a urgência de tratamento. Esta estará dependente da quantidade de compostos avaliados que não se encontrem dentro do intervalo de valores considerado saudável. A vantagem deste teste consiste exatamente na possibilidade de avaliar mais do que uma variável, o que se torna benéfico relativamente a testes individualizados de determinados compostos, os quais não têm sido conclusivos. Assim que seja possível selecionar e incluir os biomarcadores adequados neste teste, os autores sugerem que deve ser confeccionado um kit que permita uma visualização rápida dos resultados através de bandas ou faixas, sem a necessidade de análise laboratorial. A Figura 9 esquematiza o funcionamento do teste SIMMA e qual o tipo de tratamento que deve ser efetuado consoante o resultado obtido (Mira et al., 2017).

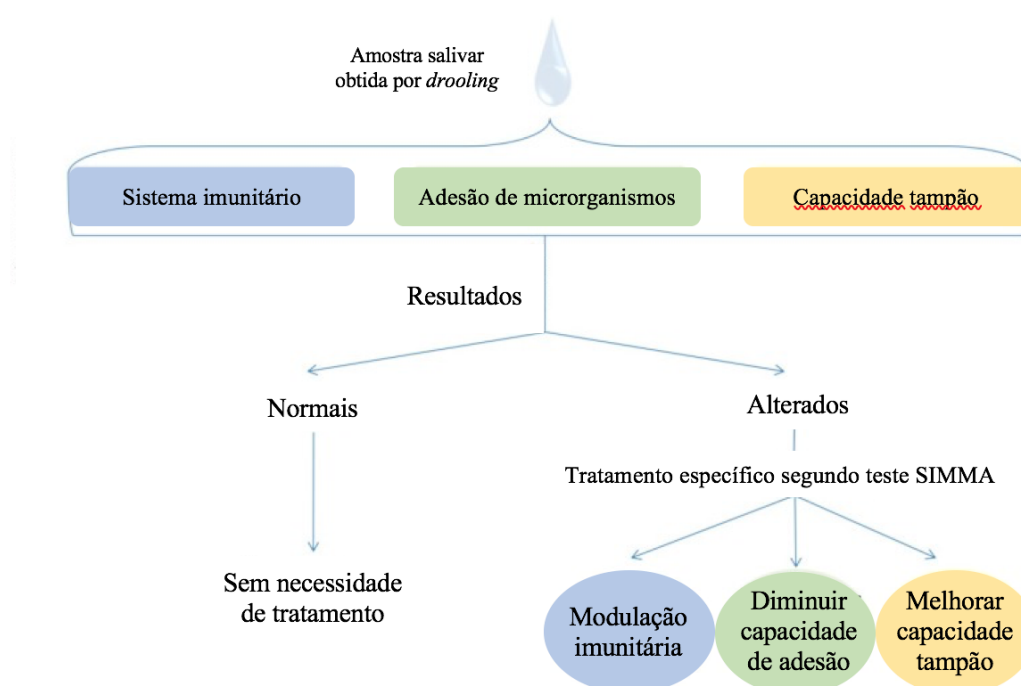


Figura 9 - Esquematização do teste SIMMA (Adaptado de Mira et al., 2017)

Existem numerosos estudos sobre as mais diversas moléculas, microrganismos e até mesmo propriedades salivares que poderão vir a ser biomarcadores salivares para a doença cárie. É importante dar continuidade a estas investigações, investindo na combinação de biomarcadores de modo a obter resultados mais conclusivos, que permitam, posteriormente, o desenvolvimento de testes comerciais com resultados rápidos e fiáveis (Javaid et al., 2016; Mira et al., 2017; Tellez et al., 2013). A Tabela IV apresenta uma lista de potenciais biomarcadores salivares para a doença cárie, referenciando a evidência na literatura desta associação (Gao et al., 2016).

Tabela IV - Potenciais biomarcadores salivares para a doença cárie e evidência na literatura dessa associação (Adaptado de: Gao et al., 2016)

Tipo de biomarcador	Biomarcadores salivares	Associação com a cárie
Microrganismos	<i>Streptococcus mutans</i>	Evidência modesta; início da colonização e aumento da concentração salivar
	<i>Lactobacillus</i>	Evidência inconsistente; consumo excessivo de açúcares
	Outros microrganismos (<i>Streptococcus salivarius</i> , <i>Streptococcus sanguinis</i> , <i>Actinomyces spp</i> e <i>Candida albicans</i>)	Evidência fraca ou ambígua
	Diversidade de microrganismos	Evidência limitada
Eletrólitos	Cálcio, fosfato, bicarbonato e flúor	Evidência limitada no efeito anti-cáries
	Cobre, magnésio, sódio, potássio e cloro	Pouca ou nenhuma evidência
Proteínas e péptidos	Imunoglobulinas (IgA, IgG e IgM)	Evidência igualmente dividida
	De defesa inata (proteínas ácidas ricas em prolina, glicoproteínas mucosas, aglutininas, amilase, lactoferrina, lisozima, péptidos, aminoácidos livres e conteúdo proteico total)	Evidência fraca ou inconsistente
	Com efeitos na química do fosfato de cálcio (estaterina, proteínas ricas em prolina, histatinas, cistatinas e mucinas)	Pouca evidência

Propriedades salivares	Taxa de fluxo salivar	Evidência forte entre a baixa taxa de fluxo salivar e prevalência, incidência e atividade de cáries; Evidência duvidosa em taxas normais
	pH e capacidade tampão	Evidência inconsistente
	Taxa de eliminação de açúcares da cavidade oral	Evidência limitada

3.3. Doença periodontal

A doença periodontal é uma doença crónica com uma prevalência mundial de 5-15% nos adultos. Ela afeta os tecidos de suporte das peças dentárias, como a gengiva, o ligamento periodontal e o osso alveolar, podendo mesmo levar à perda dentária, caso a doença não seja tratada atempadamente. A doença periodontal engloba a gengivite e a periodontite. A gengivite consiste numa inflamação reversível e superficial dos tecidos gengivais. Por sua vez, na periodontite verifica-se uma destruição inflamatória dos tecidos, devido à acumulação de placa bacteriana subgengival, e à ativação de mediadores inflamatórios nas células do indivíduo, em resposta aos agentes periopatogénicos. Tem como principais sinais clínicos, a hemorragia espontânea e/ou à sondagem periodontal, o edema gengival e a formação de bolsas periodontais. No entanto, a maioria dos doentes não apresenta sintomas dolorosos e, consequentemente, a doença periodontal vai-se desenvolvendo e progredindo na cavidade oral de modo silencioso. Os doentes periodontais não se apercebem precocemente da sua condição e apenas procuram o médico dentista quando se verifica um estado bastante avançado de destruição do periodonto, o qual é então difícil de recuperar, podendo em último caso resultar na perda de peças dentárias. O diagnóstico e tratamento são morosos e de custo elevado e a incidência desta doença tem vindo a aumentar, pelo que se torna urgente a sua prevenção, deteção precoce e monitorização. Sendo uma doença da cavidade oral, existe um contato direto permanente entre os tecidos moles e duros afetados e o fluido da cavidade oral, a saliva, razão pela qual esta pode refletir a presença de agentes patogénicos e alterações moleculares características desta doença (Ebersole et al., 2013; Javaid et al., 2016; Ji & Choi, 2015; Salminen et al., 2015; Taylor, 2014). A Figura 10 representa o aspeto clínico de um caso de periodontite crónica generalizada (Kanakdande, Patil, & Nayyar, 2015).



Figura 10 - Periodontite crônica generalizada (Fonte: Kanakdande et al., 2015)

A periodontite está associada a 5 agentes bacterianos major que têm sido detetados em conjunto na presença desta doença. São estas: *Porphyromonas gingivalis*, *Tannerella forsythia*, *Treponema denticola*, *Prevotella intermedia* e *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*. As três primeiras têm apresentado uma forte relação com a hemorragia à sondagem (HS) e a existência de bolsas periodontais profundas e muitos investigadores têm detetado elevados níveis salivares das mesmas em indivíduos que sofrem desta doença (Javaid et al., 2016; Salminen et al., 2015). Com o objetivo de compreender se as populações bacterianas presentes na saliva de doentes periodontais poderiam ser potenciais biomarcadores desta doença, Salminen et al. (2015) analisaram os níveis salivares de 4 bactérias fortemente associadas à periodontite: *P. gingivalis*, *T. forsythia*, *P. intermedia* e *A. actinomycetemcomitans*. Foi estudada uma população de 462 indivíduos: 338 com periodontite leve ou ausente e 124 com periodontite de moderada a grave. Para determinar esta classificação, utilizaram-se como parâmetros periodontais a perda de osso alveolar (POA) e a profundidade de sondagem (PS) $> 4\text{mm}$ em mais ou em menos que 4 localizações. O grupo de controlo apresentava pouca ou nenhuma POA e menos de 4 localizações com bolsas $\geq 4\text{mm}$, enquanto que a população em estudo apresentava POA moderada a severa e pelo menos 4 localizações com $\geq 4\text{mm}$ de PS. Foi feita também uma subdivisão relativa a outros parâmetros periodontais, tais como PS de 4-5mm, PS $\geq 6\text{mm}$, percentagem de HS e o grau de POA, de modo a compreender a sua associação com os periopatogénos em estudo. Foi recolhida a saliva dos vários indivíduos, após estimulação por uma pastilha de parafina. Os resultados relativos às concentrações salivares das 4 bactérias no grupo periodontite moderada a severa e a sua associação aos parâmetros

periodontais em estudo (PS 4-5mm, PS \geq 6mm, POA e HS) estão representados na Tabela V (Salminen et al., 2015).

Tabela V - Resultados do estudo de Salminen et al. (2015) relativamente à concentração salivar dos biomarcadores no grupo periodontite moderada a severa e à sua associação com os parâmetros periodontais estudados

Biomarcador salivar	Concentração salivar no grupo periodontite moderada a severa	Associação significativa de concentrações elevadas dos biomarcadores com parâmetros periodontais
<i>P. gingivalis</i>	<u>Significativamente mais elevada</u>	PS 4-5mm; PS \geq 6mm; POA
<i>T. forsythia</i>	Mais elevada	PS 4-5mm; PS \geq 6mm; POA; HS
<i>P. intermedia</i>	Mais elevada	Sem diferenças significativas
<i>A. actinomycetemcomitans</i>	Sem diferenças significativas	Sem diferenças significativas

Verificaram-se ainda resultados mais elevados da concentração total das 4 espécies em estudo no grupo periodontite moderada a severa. Apesar de todas as 4 espécies apresentarem uma correlação significativa entre si, a correlação entre a presença de *P. gingivalis* e *T. forsythia* foi maior do que entre qualquer outra relação das bactérias avaliadas. Esta relação e as concentrações salivares elevadas destas duas bactérias podem ser justificados pela forte associação das mesmas com a presença de bolsas de 4-5mm, \geq 6mm e com a POA, e no caso de *T. forsythia*, com a ocorrência de HS, que caracterizam os sinais clínicos desta doença, principalmente em fases avançadas. Os autores concluíram que foi possível confirmar a forte associação entre *P. gingivalis* e *T. forsythia* e a periodontite moderada a severa, evidenciando o benefício de utilizar a combinação destas duas bactérias como biomarcadores salivares para esta doença (Salminen et al., 2015).

Sendo uma doença multifatorial é importante a análise salivar de agentes patogénicos, mas também de outras moléculas que podem sofrer alterações na doença periodontal (Majid &

Shafi, 2014). Devido à ocorrência de fenómenos inflamatórios, há libertação de diversas moléculas capazes de representar as diferentes fases da doença periodontal e distinguir estados de saúde, gengivite e periodontite. A IL-1 β e a IL-6 são citocinas relacionadas com processos de acoplamento e reabsorção de osso, respetivamente. A MMP-8 é uma collagenase envolvida na alteração da integridade dos tecidos moles do periodonto e a MIP-1 α uma quimiocina associada à inflamação. Ainda que encontradas em algumas condições inflamatórias sistémicas, a presença destas moléculas em valores superiores na saliva tem sido detetada na doença periodontal (Ebersole, Nagarajan, Akers, & Miller, 2015; Salminen et al., 2015). Ebersole et al. (2015) estudaram o potencial de IL-1 β , IL-6, MMP-8 e MIP-1 α como biomarcadores salivares para a doença periodontal, demonstrando não só a relação destas moléculas com a doença, mas também a razão pela qual estão associadas, após análise dos parâmetros periodontais. Assim, a população em estudo foi dividida em três grupos: saúde, gengivite e periodontite. Foram considerados saudáveis os doentes com HS \leq 10% de localizações, < 3% de localizações com PS \geq 4mm, e sem localizações com perda de inserção periodontal (PIP) \geq 2mm; com gengivite os doentes com hemorragia à sondagem \geq 20% de localizações, < 3% de localizações com PS \geq 4mm e sem localizações com PIP \geq 2mm; por fim, com periodontite aqueles doentes com HS > 10% de localizações, > 5% de localizações com PS \geq 4mm e com PIP \geq 2mm. Foi recolhida saliva não estimulada de 209 indivíduos: 65 do grupo saudável, 43 com gengivite e 101 com periodontite. Na Tabela VI estão apresentados os resultados deste estudo no grupo periodontite, referenciando correlações significativas entre os biomarcadores em estudo e parâmetros periodontais avaliados (Ebersole et al., 2015).

Tabela VI – Resultados do estudo de Ebersole et al. (2015) no grupo periodontite e respetiva associação entre os biomarcadores em estudo e os parâmetros periodontais estudados

Biomarcador salivar	Concentração salivar no grupo periodontite	Associação significativa com parâmetros periodontais
IL-1β	Significativamente mais elevada	HS; PS
IL-6	Significativamente mais elevada	HS
MMP-8	Significativamente mais elevada	HS; PS
MIP-1α	Significativamente mais elevada	Sem diferenças significativas

Somente os níveis de MMP-8 permitiram estabelecer uma diferença mais significativa entre grupos, particularmente entre o grupo de controlo e o grupo com gengivite, provavelmente devido à inflamação instalada nos tecidos moles e consequente alteração dos mesmos, nesta condição. Verificou-se ainda que a sensibilidade, especificidade e exatidão para distinguir os três grupos, era superior ao utilizar uma combinação destes biomarcadores. Apenas a inclusão de MIP-1 α nas diferentes combinações demonstrou ser pouco benéfica. Os autores deste estudo concluíram que biomarcadores específicos e a sua combinação tornam possível aumentar a sensibilidade e especificidade na deteção da doença periodontal (Ebersole et al., 2015).

Os resultados obtidos no estudo previamente descrito estão em concordância com outras investigações que também estabeleceram uma relação entre os níveis salivares elevados de IL-1 β , IL-6 e MMP-8 e a periodontite. Ebersole et al. (2013) defenderam que a utilização combinada destes biomarcadores para a deteção da periodontite é vantajosa e deve continuar a ser explorada em populações maiores. Particularmente, numa revisão de Jaedicke, Preshaw, & Taylor (2016), estes concluíram que a IL-1 β era atualmente um dos biomarcadores salivares estudados mais fortemente associados à doença periodontal. No caso da MMP-8, os níveis salivares desta molécula permitem indicar a severidade e a atividade da doença periodontal, pelo que a MMP-8 tem um papel importante na previsão da progressão desta doença (Majid & Shafi, 2014; Rathnayake et al., 2013).

Sexton et al. (2011) salientaram ainda que, após o tratamento periodontal (alisamento radicular e motivação para as regras de higiene oral), os níveis salivares de moléculas como MMP-8, OPG, MIP-1 α e IL-1 β diminuíram, tendo sido consideradas como os melhores biomarcadores salivares para traduzir a resposta ao tratamento localizado em doentes periodontais crónicos, durante um período de 6 meses (Sexton et al., 2011).

Atualmente têm sido realizados estudos com o objetivo de identificar doentes com periodontite, através de um teste baseado num imunoensaio de uma MMP-8 ativa (aMMP-8), designado de PerioSafe®. É feita uma lavagem da cavidade oral durante 30 segundos com água da torneira, aguarda-se outros 30 segundos e é feita nova lavagem com o líquido incluído no kit de diagnóstico (água destilada), durante mais 30 segundos. Na seringa contida no kit, são recolhidos 3ml da amostra e é colocado um filtro. Seguidamente vertem-se algumas gotas no

leitor do teste, o qual consiste num imunoensaio de fluxo lateral e se assemelha a um teste de gravidez. Ao fim de 5 minutos, é possível obter o resultado. A observação de apenas uma linha azul (linha de controlo) indica ausência de risco, enquanto que duas linhas azuis (linha de controlo + linha de teste) reflete um risco aumentado para a periodontite (Heikkinen et al., 2016; Rathnayake et al., 2017; Sorsa et al., 2017). A Figura 11 ilustra o conteúdo do kit PerioSafe® e dois testes com resultados diferentes, positivo (5A) e negativo (5B) (Sorsa et al., 2017).

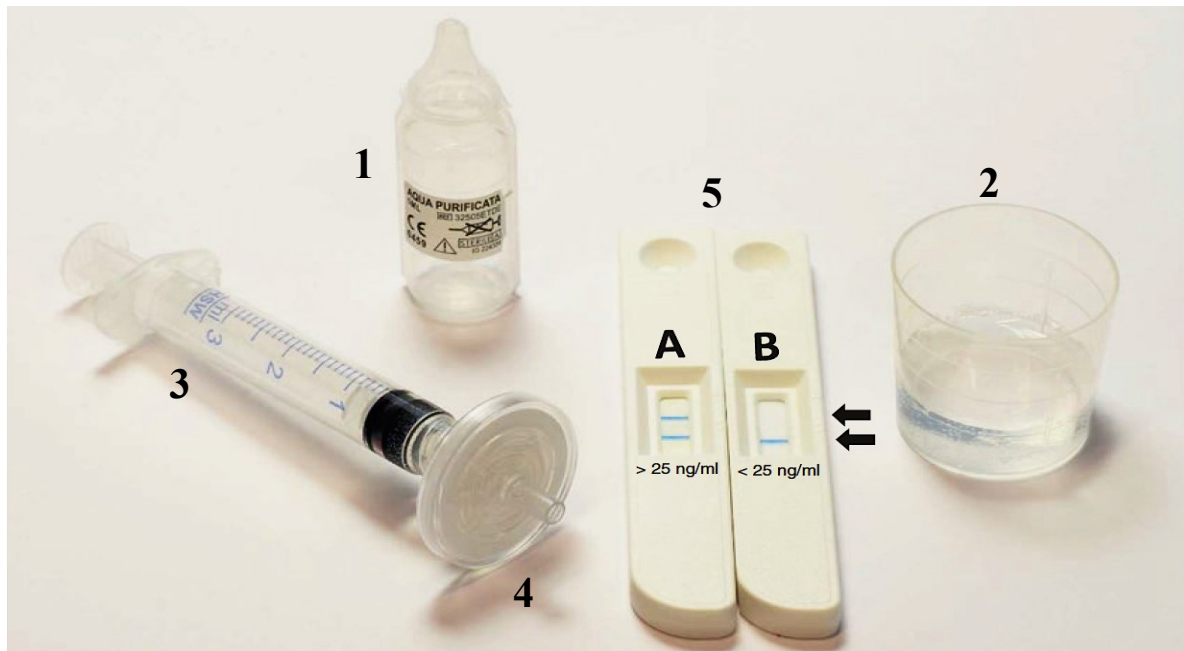


Figura 11 - Kit PerioSafe®: 1) Líquido para bochecho – água destilada; 2 – Copo para colocação do líquido antes do bochecho e da amostra após bochecho; 3) Seringa para recolha de 3ml da amostra; 4) Filtro colocado na seringa; 5) Testes com dois resultados diferentes - A) Teste positivo (> 25ng/ml); B) Teste negativo (< 25ng/ml) (Adaptado de Sorsa et al., 2017)

Num estudo de Heikkinen et al. (2016) com 47 doentes (14 positivos e 33 negativos), todos adolescentes finlandeses, este teste apresentou resultados promissores, sendo vantajoso devido ao seu baixo custo, rapidez e facilidade de detecção do risco periodontal. Estes autores avaliaram ainda a sensibilidade e especificidade deste teste relativamente a localizações com PS \geq 4mm, cujos resultados podem ser observados na Tabela VII (Heikkinen et al., 2016; Sorsa et al., 2017).

Tabela VII - Especificidade e Sensibilidade do teste PerioSafe® aMMP-8 em adolescentes finlandeses (Adaptado de Heikkinen et al., 2016; Sorsa et al., 2017)

Parâmetro clínico	Sensibilidade (%)	Especificidade (%)
PS \geq 4mm em \geq 1 localização	48,3	100
PS \geq 4mm em \geq 2 localizações	63,6	100
PS \geq 4mm em $>$ 2 localizações	76,5	96,7

O teste PerioSafe® tem sido considerado um dos poucos que envolve um biomarcador salivar que poderá identificar a presença da doença periodontal e a sua atividade. Possibilita ainda prever a progressão desta doença e monitorizar a resposta do organismo ao tratamento periodontal (Ghallab, 2018; Heikkinen et al., 2016).

Outros 2 testes que têm sido aplicados nos Estados Unidos e no Canadá são o MyPerioPath® e o MyPerioID®. O primeiro consegue detetar a maioria dos agentes patogénicos associados à periodontite, enquanto que o segundo avalia o risco de periodontite crónica associada a mutações genéticas do gene IL-6 (Javaid et al., 2016).

Sendo a doença periodontal frequentemente associada à presença de alguns agentes periopatogénicos e de moléculas produzidas em resposta à inflamação oral, como já foi referido em estudos anteriormente descritos, é possível que a avaliação e combinação destes dois parâmetros apresente resultados mais promissores na deteção desta doença. Assim, Salminen et al. (2014) estudaram a associação da periodontite aos níveis salivares de MMP-8, IL-1 β e *P. gingivalis*, numa população de 493 indivíduos. Foram utilizados diversos critérios de divisão em diferentes grupos. Relativamente à presença de periodontite, existiam 340 indivíduos com pouca ou nenhuma manifestação da doença (pouca ou nenhuma POA ou $<$ 4 localizações com PS \geq 4mm) e 123 com periodontite moderada a severa (POA moderada a severa e pelo menos 4 localizações com PS \geq 4mm). Foi recolhida saliva estimulada após mastigação de uma pastilha de parafina durante 5 minutos. Os resultados deste estudo relativamente às concentrações salivares de MMP-8, IL-1 β e *P. gingivalis* na periodontite moderada a severa e

sua associação significativa com os parâmetros periodontais em estudo (HS, PS e POA) estão apresentados na Tabela VIII (Salminen et al., 2014).

Tabela VIII – Resultados do estudo realizado por Salminen et al. (2014), relativamente às concentrações salivares de MMP-8, IL-1 β e *P. gingivalis* na periodontite moderada a severa e sua associação significativa com os parâmetros periodontais em estudo

Biomarcador salivar	Concentração salivar na periodontite moderada a severa	Associação significativa com parâmetros periodontais
MMP-8	Significativamente mais elevada	HS
IL-1 β	Significativamente mais elevada	PS
<i>P. gingivalis</i>	Significativamente mais elevada	POA

Tal como já foi referido, a doença periodontal pode estar associada à ação de uma grande variedade de fatores que têm sido estudadas como potenciais biomarcadores salivares para a doença periodontal. Estes biomarcadores podem ser provenientes de agentes bacterianos ou então do próprio hospedeiro, ou estar associadas a determinadas fases de progressão desta doença, tais como a inflamação, destruição de tecidos moles e destruição de tecidos duros (osso alveolar). Para serem considerados bons marcadores da periodontite é necessário que possuam algumas propriedades: “diagnóstico da presença da doença periodontal; tradução da sua severidade; monitorização de resposta ao tratamento; e previsão do prognóstico/progresso da doença” (Ji & Choi, 2015). As Tabelas IX-XII, representam uma lista exaustiva, elaborada por estes autores, de biomarcadores relacionados com agentes bacterianos (Tabela IX), com fenómenos inflamatórios (Tabela X), com destruição de tecidos moles (Tabela XI) e com destruição de tecidos duros (Tabela XII), que satisfazem pelo menos uma das características anteriormente descritas. Os biomarcadores foram classificados relativamente à sua associação com a periodontite: forte (F) se satisfaziam pelo menos 3 das 4 características em pelo menos 3 estudos diferentes; questionável (Q) se a quantidade de estudos contraditórios ou sem diferenças significativas era maior ou igual aos que apresentavam relação com esta doença; e potenciais (P) para os restantes (Ji & Choi, 2015).

Tabela IX - Biomarcadores salivares associados a agentes bacterianos (Adaptado de Ji & Choi, 2015).

Tipo de biomarcador	Biomarcadores salivares	Relação com a periodontite
DNA	<i>Porphyromonas gingivalis</i>	F
	<i>Prevotella intermedia</i>	F
	<i>Tannerella forsythia</i>	F
	<i>Treponema denticola</i>	P
	<i>Campylobacter rectus</i>	P
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> + <i>Acinetobacter</i> spp.	P
	<i>Peptostreptococcus micros</i>	P
	<i>Fusobacterium nucleatum</i>	Q
	<i>Aggregatibacter actinomycetemcomitans</i>	Q
Proteínas	Dipeptidil peptidase	P

Tabela X - Biomarcadores salivares associados a fenômenos inflamatórios (Adaptado de Ji & Choi, 2015).

Tipo de biomarcador	Biomarcadores salivares	Relação com a periodontite
Proteínas	IL-1 β	F
	MIP-1 α	F
	Arginase	F
	CD14 solúvel	P
	IFN- γ e rácio IFN- γ /IL-22	P
	Lactoferrina	P
	Dipeptidil peptidase	P
	<i>Chemerin</i>	P
	Procalcitonina	P
	Calprotectina	P
	Mieloperoxidase	P
	IL-18	P
	TLR4	P

	β -glucuronidase	P
	CRP	P
	IL-6	Q
	IL-8	Q
	TNF- α	Q
Metabolitos	Óxido nítrico	F
	8-hidroxi-2-deoxiguanosina	F
	Fator ativador de plaquetas	P
	Neopterina	P
	Ácidos gordos ω -3 (ácido docosapentaenóico) e ω -6 (ácidos linoleico e araquidônico)	P

Tabela XI - Biomarcadores salivares associados à destruição de tecidos moles (Adaptado de Ji & Choi, 2015).

Tipo de biomarcador	Biomarcadores salivares	Relação com a periodontite
Proteínas	MMP-8	F
	HGF	F
	Aspartato aminotransferase	P
	Lactato desidrogenase	P
	MMP-9	P
	TIMP-2	P
	Alanina aminotransferase	Q
	TIMP-1	Q
Metabolitos	De degradação de purinas (ex: guanosina e inosina)	P
	De dipéptidos, aminoácidos, hidratos de carbono, lípidos e nucleótidos	P

Tabela XII - Biomarcadores salivares associados à destruição de tecidos duros (Adaptado Ji & Choi, 2015).

Tipo de biomarcador	Biomarcadores salivares	Relação com a periodontite
Proteínas	Fosfatase alcalina	P
	Osteonectina	P
	RANKL	P
	Osteoprotegerina	Q
Metabolitos	Cálcio	P
	Piridinolina – Telopéptido C-terminal (do colagénio tipo I)	Q

III – CONCLUSÃO

Nos últimos anos, a utilização do fluido biológico saliva como meio de diagnóstico tem vindo a aumentar. Os resultados, que eram anteriormente escassos, têm-se atualmente revelado promissores. Tal evolução deve-se aos avanços nos métodos de identificação e análise de potenciais biomarcadores salivares, que têm possibilitado estabelecer uma relação entre estes e múltiplas doenças. Sendo a saliva um fluido presente na cavidade oral, é possível que a sua composição sofra alterações quando se instalam doenças orais. Entre essas encontram-se as abordadas na presente monografia: o cancro oral, a cárie dentária e a doença periodontal. A análise salivar para deteção destas doenças, determinação do risco para as desenvolver ou mesmo a resposta do organismo a tratamentos específicos, foi demonstrada com sucesso em alguns estudos.

Relativamente ao cancro oral, particularmente no OSCC, os biomarcadores salivares que têm evidenciado dados mais relevantes são:

- Na deteção do risco, a presença de HPV-16;
- No diagnóstico, a combinação de biomarcadores, como os metabolitos colina, betaína, ácido pipercolico e L-carnitina; as proteínas M2BP, MRP14, CD59, catalase e profilina; a proteína IL-8 e o mRNA IL-1 β ; e dos mRNAs IL-8, SAT e H3F3A.

Os biomarcadores salivares que atualmente apresentam maior evidência científica na sua relação com a cárie dentária são a baixa taxa de fluxo salivar e os microrganismos *Streptococcus mutans*.

Na doença periodontal, os biomarcadores salivares mais fortemente relacionados com esta doença e capazes de a detetar e monitorizar estão essencialmente associados a:

- Agentes bacterianos: *Porphyromonas gingivalis*, *Tannerella forsythia* e *Prevotella intermedia*;
- Fenómenos inflamatórios: proteínas IL-1 β , MIP-1 α e arginase; metabolitos óxido nítrico e 8-hidroxi-2-deoxiguanosina;
- Destruição de tecidos moles: proteínas MMP-8 e HGF;
- Destruição de tecidos duros, apesar de, atualmente ainda não ter sido detetado nenhum biomarcador salivar com forte relação com a periodontite.

A detecção precoce destas doenças orais possibilita iniciar rapidamente o tratamento adequado e prevenir a sua progressão para fases mais avançadas, as quais poderão ser irreversíveis ou até mesmo implicar uma drástica diminuição da taxa de sobrevida, como ocorre no cancro oral.

A literatura evidencia ainda o benefício da combinação de biomarcadores salivares na obtenção de um diagnóstico correto, melhorando a sensibilidade e a especificidade na detecção de doenças orais como o cancro oral e a doença periodontal, apresentando melhores resultados que os estudos que avaliam biomarcadores individuais.

Existem testes salivares comerciais que recorrem a biomarcadores para as doenças orais mencionadas, de fácil aplicação, e que são já muito utilizados atualmente. Outros encontram-se em desenvolvimento, com o objetivo de melhorar os resultados do diagnóstico salivar, selecionando biomarcadores adequados para as doenças em questão.

A utilização da saliva como método de diagnóstico, apesar de já ser uma realidade, comporta ainda alguns obstáculos no que concerne à sua aplicação universal. Existe uma grande diversidade entre as populações estudadas e as condições de recolha, bem como há a considerar a presença de outros fatores tais como doenças sistémicas ou a ingestão de medicamentos, que levam à existência de estudos contraditórios. De modo a ultrapassar estas barreiras, é importante a validação científica dos potenciais biomarcadores para as diferentes doenças, a correlação significativa entre as suas concentrações moleculares no sangue e na saliva e o desenvolvimento de métodos de detecção eficazes de moléculas em concentrações reduzidas. Será também fundamental a realização de estudos com populações de maior dimensão de modo a permitir a obtenção de resultados mais conclusivos e a standardização de métodos de recolha, processamento e análise das amostras salivares.

Em suma, a análise salivar para detecção de doenças, principalmente recorrendo à combinação de biomarcadores, tem apresentado resultados promissores. É necessário dar continuidade aos estudos e aos investimentos que têm sido feitos, superando as dificuldades suscitadas, desenvolvendo novas tecnologias e investindo na combinação de biomarcadores. Deste modo, é previsível que a utilização da saliva como meio de diagnóstico tenha um impacto significativo no futuro da medicina dentária e que se torne

uma alternativa viável a outros fluidos biológicos, com resultados fidedignos na detecção precoce de estados de doença.

IV – BIBLIOGRAFIA

- Agha-Hosseini, F., Mirzaii-Dizgah, I., & Miri-Zarandi, N.-S. (2015). Unstimulated salivary p53 in patients with oral lichen planus and squamous cell carcinoma. *Acta Medica Iranica*, 53(7), 439–443. Retrieved from <http://www.embase.com/search/results?subaction=viewrecord&from=export&id=L605439106%5Cnhttp://za2uf4ps7f.search.serialssolutions.com/?sid=EMBASE&issn=17359694&id=doi:&atitle=Unstimulated+salivary+p53+in+patients+with+oral+lichen+planus+and+squamous+cell+c>
- Baum, B. J., Yates, J. R., Srivastava, S., Wong, D. T., & Melvin, J. E. (2011). Scientific frontiers: emerging technologies for salivary diagnostics. *Advances in Dental Research*, 23(4), 360–368. <https://doi.org/10.1177/0022034511420433>
- Belstrøm, D., Holmstrup, P., Fiehn, N. E., Kirkby, N., Kokaras, A., Paster, B. J., & Bardow, A. (2017). Salivary microbiota in individuals with different levels of caries experience. *Journal of Oral Microbiology*, 9(1), 1–8. <https://doi.org/10.1080/20002297.2016.1270614>
- Beltrán-Aguilar, E. D., Barker, L. K., Canto, M. T., Dye, B. A., Gooch, B. F., Griffin, S. O., ... Wu, T. (2005). Surveillance for dental caries, dental sealants, tooth retention, edentulism, and enamel fluorosis - United States, 1988-1994 and 1999-2002. *Journal of the Canadian Dental Association*, 71(10). <https://doi.org/ss5403a1> [pii]
- Bettuzzi, S., Davalli, P., Astancolle, S., Carani, C., Madeo, B., Tampieri, a, ... Arnaldo, C. (2000). Tumor progression is accompanied by significant changes in the levels of expression of polyamine metabolism regulatory genes and clusterin (sulfated glycoprotein 2) in human prostate cancer specimens. *Cancer Research*, 60(1), 28–34. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.can-05-1145>
- Bödör, C., Matolcsy, A., & Bernáth, M. (2007). Elevated expression of Cu, Zn-SOD and Mn-SOD mRNA in inflamed dental pulp tissue. *International Endodontic Journal*, 40(2), 128–132. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2591.2006.01196.x>
- Chang, K. P., Chang, Y. T., Liao, C. T., Yen, T. C., Chen, I. H., Chang, Y. L., ... Wu, C. C. (2011). Prognostic cytokine markers in peripheral blood for oral cavity squamous cell carcinoma identified by multiplexed immunobead-based profiling. *Clinica Chimica Acta*, 412(11–12), 980–987. <https://doi.org/10.1016/j.cca.2011.02.002>
- Chiappin, S., Antonelli, G., Gatti, R., & De Palo, E. F. (2007). Saliva specimen: A new laboratory tool for diagnostic and basic investigation. *Clinica Chimica Acta*, 383(1–2),

- 30–40. <https://doi.org/10.1016/j.cca.2007.04.011>
- Csosz, É., Lábiscsák, P., Kalló, G., Márkus, B., Emri, M., Szabó, A., ... Márton, I. (2017). Proteomics investigation of OSCC-specific salivary biomarkers in a Hungarian population highlights the importance of identification of population-tailored biomarkers. *PLoS ONE*, 12(5), 1–21. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0177282>
- Deepa, T., & Thirrunavukkarasu, N. (2010). Saliva as a potential diagnostic tool. *Indian Journal of Medical Sciences*, 64(7), 293. <https://doi.org/10.4103/0019-5359.99854>
- Ebersole, J. L., Nagarajan, R., Akers, D., & Miller, C. S. (2015). Targeted salivary biomarkers for discrimination of periodontal health and disease(s). *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 5(August), 1–12. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2015.00062>
- Ebersole, J. L., Schuster, J. L., Stevens, J., Dawson, D., Kryscio, R. J., Lin, Y., ... Miller, C. S. (2013). Patterns of salivary analytes provide diagnostic capacity for distinguishing chronic adult periodontitis from health. *Journal of Clinical Immunology*, 33(1), 271–279. <https://doi.org/10.1007/s10875-012-9771-3>
- Farges, J. C., Carrouel, F., Keller, J. F., Baudouin, C., Msika, P., Bleicher, F., & Staquet, M. J. (2011). Cytokine production by human odontoblast-like cells upon Toll-like receptor-2 engagement. *Immunobiology*. <https://doi.org/10.1016/j.imbio.2010.08.006>
- Farnaud, S. J. C., Kosti, O., Getting, S. J., & Renshaw, D. (2010). Saliva: Physiology and Diagnostic Potential in Health and Disease. *The Scientific World JOURNAL*, 10, 434–456. <https://doi.org/10.1100/tsw.2010.38>
- Fleissig, Y., Reichenberg, E., Redlich, M., Zaks, B., Deutsch, O., Aframian, D. J., & Palmon, A. (2010). Comparative proteomic analysis of human oral fluids according to gender and age. *Oral Diseases*, 16(8), 831–838. <https://doi.org/10.1111/j.1601-0825.2010.01696.x>
- Gabryel-Porowska, H., Gornowicz, A., Bielawska, A., Wójcicka, A., Maciorkowska, E., Grabowska, S. Z., & Bielawski, K. (2014). Mucin levels in saliva of adolescents with dental caries. *Medical Science Monitor : International Medical Journal of Experimental and Clinical Research*, 20, 72–77. <https://doi.org/10.12659/MSM.889718>
- Gao, X., Jiang, S., Koh, D., & Hsu, C.-Y. S. (2016). Salivary biomarkers for dental caries. *Periodontology 2000*, 70(1), 128–141. <https://doi.org/10.1111/prd.12100>
- García-Godoy, F., & Hicks, M. J. (2008). Maintaining the integrity of the enamel surface: the role of dental biofilm, saliva and preventive agents in enamel demineralization and remineralization. *Journal of the American Dental Association (1939)*, 139 Suppl, 25S–34S. <https://doi.org/10.14219/jada.archive.2008.0352>

- Ghallab, N. A. (2018). Diagnostic potential and future directions of biomarkers in gingival crevicular fluid and saliva of periodontal diseases: Review of the current evidence. *Archives of Oral Biology*, 87(December 2017), 115–124. <https://doi.org/10.1016/j.archoralbio.2017.12.022>
- Gleber-Netto, F. O., Yakob, M., Li, F., Feng, Z., Dai, J., Kao, H.-K., ... Wong, D. T. W. (2016). Salivary biomarkers for detection of oral squamous cell carcinoma in a Taiwanese population. *Clinical Cancer Research*, 22(13). <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-15-1761>
- Gornowicz, A., Bielawska, A., Bielawski, K., Grabowska, S. Z., Wójcicka, A., Zalewska, M., & Maciorkowska, E. (2012). Pro-inflammatory cytokines in saliva of adolescents with dental caries disease. *Annals of Agricultural and Environmental Medicine*, 19(4), 711–716.
- Gröschl, M. (2017). Saliva: a reliable sample matrix in bioanalytics. *Bioanalysis*, 9(8), 655–668. <https://doi.org/10.4155/bio-2017-0010>
- Hardt, M., Witkowska, H. E., Webb, S., Thomas, L. R., Dixon, S. E., Hall, S. C., & Fisher, S. J. (2005). Assessing the effects of diurnal variation on the composition of human parotid saliva: quantitative analysis of native peptides using iTRAQ reagents. *Anal Chem*, 77(15), 4947–4954. <https://doi.org/10.1021/ac050161r>
- He, Q. Y., Chen, J., Kung, H. F., Po-Wing Yuen, A., & Chiu, J. F. (2004). Identification of tumor-associated proteins in oral tongue squamous cell carcinoma by proteomics. *Proteomics*, 4(1), 271–278. <https://doi.org/10.1002/pmic.200300550>
- Hegde, M. N., Hegde, N. D., Ashok, A., & Shetty, S. (2014). Biochemical indicators of dental caries in Saliva: An in vivo study. *Caries Research*, 48(2), 170–173. <https://doi.org/10.1159/000355580>
- Heikkinen, A. M., Nwhator, S. O., Rathnayake, N., Mäntylä, P., Vatanen, P., & Sorsa, T. (2016). Pilot Study on Oral Health Status as Assessed by an Active Matrix Metalloproteinase-8 Chairside Mouthrinse Test in Adolescents. *Journal of Periodontology*, 87(1), 36–40. <https://doi.org/10.1902/jop.2015.150377>
- Ho, M. W., Risk, J. M., Woolgar, J. A., Field, E. A., Field, J. K., Steele, J. C., ... Shaw, R. J. (2012). The clinical determinants of malignant transformation in oral epithelial dysplasia. *Oral Oncology*, 48(10), 969–976. <https://doi.org/10.1016/j.oraloncology.2012.04.002>
- Hu, S., Arellano, M., Boonthueung, P., Wang, J., Zhou, H., Jiang, J., ... Wong, D. T. (2008). Salivary proteomics for oral cancer biomarker discovery. *Clinical Cancer Research*,

- 14(19), 6246–6252. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-07-5037>
- Huang, C. M., Ananthaswamy, H. N., Barnes, S., Ma, Y., Kawai, M., & Elmets, C. A. (2006). Mass spectrometric proteomics profiles of in vivo tumor secretomes: Capillary ultrafiltration sampling of regressive tumor masses. *Proteomics*, 6(22), 6107–6116. <https://doi.org/10.1002/pmic.200600287>
- Jaedicke, K. M., Preshaw, P. M., & Taylor, J. J. (2016). Salivary cytokines as biomarkers of periodontal diseases. *Periodontology 2000*, 70(1), 164–183. <https://doi.org/10.1111/prd.12117>
- Jasim, H., Olausson, P., Hedenberg-Magnusson, B., Ernberg, M., & Ghafouri, B. (2016). The proteomic profile of whole and glandular saliva in healthy pain-free subjects. *Scientific Reports*, 6, 1–10. <https://doi.org/10.1038/srep39073>
- Javaid, M. A., Ahmed, A. S., Durand, R., & Tran, S. D. (2016). Saliva as a diagnostic tool for oral and systemic diseases. *Journal of Oral Biology and Craniofacial Research*, 6(1), 67–76. <https://doi.org/10.1016/j.jobcr.2015.08.006>
- Jenkinson, H. F., & Lamont, R. J. (2005). Oral microbial communities in sickness and in health. *Trends in Microbiology*, 13(12), 589–595. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2005.09.006>
- Ji, S., & Choi, Y. (2015). Point-of-care diagnosis of periodontitis using saliva: technically feasible but still a challenge. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 5(September), 1–9. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2015.00065>
- Kaczor-Urbanowicz, K. E., Martin Carreras-Presas, C., Aro, K., Tu, M., Garcia-Godoy, F., & Wong, D. T. W. (2017). Saliva diagnostics – Current views and directions. *Experimental Biology and Medicine*, 242(5), 459–472. <https://doi.org/10.1177/1535370216681550>
- Kamatani, T., Shiogama, S., Yoshihama, Y., Kondo, S., Shiota, T., & Shintani, S. (2013). Interleukin-1 beta in unstimulated whole saliva is a potential biomarker for oral squamous cell carcinoma. *Cytokine*, 64(2), 497–502. <https://doi.org/10.1016/j.cyto.2013.08.011>
- Kanakdande, V., Patil, K. P., & Nayyar, A. S. (2015). Comparative Evaluation of Clinical, Hematological and Systemic Inflammatory Markers in Smokers and Non-Smokers with Chronic Periodontitis. *Contemporary Clinical Dentistry*, 6(3), 348–357. <https://doi.org/10.4103/0976-237X.161885>
- Katz-Brull, R., Margalit, R., & Degani, H. (2001). Differential routing of choline in implanted breast cancer and normal organs. *Magnetic Resonance in Medicine*, 46(1), 31–38. <https://doi.org/10.1002/mrm.1157>

- Kaur, J., Jacobs, R., Huang, Y., Salvo, N., & Politis, C. (2018). Salivary biomarkers for oral cancer and pre-cancer screening: a review. *Clinical Oral Investigations*, 22(2), 633–640. <https://doi.org/10.1007/s00784-018-2337-x>
- Kaur, S., Kaur, K., Rai, S., & Khajuria, R. (2015). Oral health management considerations in patients with diabetes mellitus. *Archives of Medicine and Health Sciences*, 3(1), 72. <https://doi.org/10.4103/2321-4848.154949>
- Kivlighan, K. T., Granger, D. A., Schwartz, E. B., Nelson, V., Curran, M., & Shirtliff, E. A. (2004). Quantifying blood leakage into the oral mucosa and its effect on the measurement of cortisol, dehydroepiandrosterone and testosterone in saliva. *Hormones and Behavior*, 46, 39–46. <https://doi.org/10.1016/j.yhbeh.2004.01.006>
- Lee, L. T., Wong, Y. K., Hsiao, H. Y., Wang, Y. W., Chan, M. Y., & Chang, K. W. (2017). Evaluation of saliva and plasma cytokine biomarkers in patients with oral squamous cell carcinoma. *International Journal of Oral and Maxillofacial Surgery*. <https://doi.org/10.1016/j.ijom.2017.09.016>
- Lee, Y. H., & Wong, D. T. (2009). Saliva: An emerging biofluid for early detection of diseases. *American Journal of Dentistry*, 22(4), 241–248. <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2008.05.010>
- Li, Y., John, M. A. R. S., Zhou, X., Kim, Y., Sinha, U., Jordan, R. C. K., ... Wong, D. T. (2004). Salivary Transcriptome Diagnostics for Oral Cancer Detection Salivary Transcriptome Diagnostics for Oral Cancer Detection. *Clin Cancer Res*, 10(310), 8442–8450. <https://doi.org/10.24/8442> [pii]r10.1158/1078-0432.CCR-04-1167
- Lima, D. P., Diniz, D. G., Moimaz, S. A. S., Sumida, D. H., & Okamoto, A. C. (2010). Saliva: reflection of the body. *International Journal of Infectious Diseases*, 14(3), 184–188. <https://doi.org/10.1016/j.ijid.2009.04.022>
- Lima, D. P., Sales, A., Correia, C., Lima, A., & Anjos, D. O. S. (2014). O Uso de Saliva para Diagnóstico e Doenças Orais e Sistêmicas. *Revista Odontológica de Araçatuba*, 35(1), 55–59.
- Lippman, S. M., Sudbø, J., & Hong, W. K. (2005). Oral cancer prevention and the evolution of molecular-targeted drug development. *Journal of Clinical Oncology*, 23(2), 346–356. <https://doi.org/10.1200/JCO.2005.09.128>
- Loke, C., Lee, J., Sander, S., Mei, L., & Farella, M. (2016). Factors affecting intra-oral pH - a review. *Journal of Oral Rehabilitation*, 43(10), 778–785. <https://doi.org/10.1111/joor.12429>
- Madalli, V. B., Basavaraddi, S. M., Burde, K., & Horatti, P. (2013). Saliva- A Diagnostic

- Tool, 11(6), 96–99.
- Majid, D., & Shaf, D. M. (2014). Saliva as a diagnostic tool: A review. *IOSR Journal of Pharmacy and Biological Sciences*, 9(1), 09–14. doi:10.9790/3008 09120914
- Malamud, D., & Rodriguez-Chavez, I. R. (2011). Saliva as a Diagnostic Fluid. *Dental Clinics of North America*, 55(1), 159–178. <http://doi.org/10.1016/j.cden.2010.08.004>
- Malathi, N., Mythili, S., & Vasanthi, H. R. (2014). Salivary Diagnostics: A Brief Review. *ISRN Dentistry*, 2014, 1–8. <https://doi.org/10.1155/2014/158786>
- Marur, S., D'Souza, G., Westra, W. H., & Forastiere, A. A. (2010). HPV-associated head and neck cancer: A virus-related cancer epidemic. *The Lancet Oncology*. [https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(10\)70017-6](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(10)70017-6)
- McEligot, A. J., Yang, S., & Meyskens, Jr., F. L. (2005). Redox Regulation By Intrinsic Species and Extrinsic Nutrients in Normal and Cancer Cells. *Annual Review of Nutrition*, 25(1), 261–295. <https://doi.org/10.1146/annurev.nutr.25.050304.092633>
- Messadi, D. V. (2013). Diagnostic aids for detection of oral precancerous conditions. *International Journal of Oral Science*, 5(2), 59–65. <https://doi.org/10.1038/ijos.2013.24>
- Messadi, D. V, Wilder-Smith, P., & Wolinsky, L. (2009). Improving oral cancer survival: the role of dental providers. *Journal of the California Dental Association*, 37(11), 789–798. Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2866626&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- Mira, A., Artacho, A., Camelo-Castillo, A., Garcia-Esteban, S., & Simon-Soro, A. (2017). Salivary Immune and Metabolic Marker Analysis (SIMMA): A Diagnostic Test to Predict Caries Risk. *Diagnostics*, 7(3), 38. <https://doi.org/10.3390/diagnostics7030038>
- Monteiro, L., Amaral, J., Vizcaino, J., Lopes, C., & Torres, F. (2014). A clinical-pathological and survival study of oral squamous cell carcinomas from a population of the North of Portugal. *Medicina Oral Patología Oral y Cirugía Bucal*, 19(2), e120–e126. <https://doi.org/10.4317/medoral.19090>
- Monteiro, L. S., Antunes, L., Bento, M. J., & Warnakulasuriya, S. (2013). Incidence rates and trends of lip, oral and oro-pharyngeal cancers in Portugal. *Journal of Oral Pathology and Medicine*, 42(4), 345–351. <https://doi.org/10.1111/jop.12010>
- Nair, D. R., Pruthy, R., Pawar, U., & Chaturvedi, P. (2012). Oral cancer: Premalignant conditions and screening--an update. *Journal of Cancer Research and Therapeutics*, 8 Suppl 1, S57-66. <https://doi.org/10.4103/0973-1482.92217>
- Napier, S. S., & Speight, P. M. (2008). Natural history of potentially malignant oral lesions

- and conditions: An overview of the literature. *Journal of Oral Pathology and Medicine*, 37(1), 1–10. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0714.2007.00579.x>
- Neyraud, E., Palicki, O., Schwartz, C., Nicklaus, S., & Feron, G. (2012). Variability of human saliva composition: Possible relationships with fat perception and liking. *Archives of Oral Biology*, 57(5), 556–566. <https://doi.org/10.1016/j.archoralbio.2011.09.016>
- Nunes, L. A. S., Mussavira, S., & Bindhu, O. S. (2015). Clinical and diagnostic utility of saliva as a non-invasive diagnostic fluid: A systematic review. *Biochemia Medica*, 25(2), 177–192. <https://doi.org/10.11613/BM.2015.018>
- Offner, G. D., & Troxler, R. F. (2000). Heterogeneity of high-molecular-weight human salivary mucins. *Advances in Dental Research*, 14, 69–75. <https://doi.org/10.1177/08959374000140011101>
- Pan, H. B., & Darvell, B. W. (2007). Solubility of calcium fluoride and fluorapatite by solid titration. *Archives of Oral Biology*, 52(9), 861–868. <https://doi.org/10.1016/j.archoralbio.2007.03.002>
- Park, Y. P., Choi, S. C., Kim, J. H., Song, E. Y., Kim, J. W., Yoon, D. Y., ... Lee, H. G. (2007). Up-regulation of Mac-2 binding protein by hTERT in gastric cancer. *International Journal of Cancer*, 120(4), 813–820. <https://doi.org/10.1002/ijc.22369>
- Pepe, M. S., Feng, Z., Janes, H., Bossuyt, P. M., & Potter, J. D. (2008). Pivotal evaluation of the accuracy of a biomarker used for classification or prediction: Standards for study design. *Journal of the National Cancer Institute*, 100(20), 1432–1438. <https://doi.org/10.1093/jnci/djn326>
- Pezelj-Ribaric, S., Prpic, J., & Glazar, I. (2015). SALIVA AS A DIAGNOSTIC FLUID. *SANAMED*, 10(3), 215–220. doi:<http://dx.doi.org/10.24125/sanamed.v10i3.40>
- Pfaffe, T., Cooper-White, J., Beyerlein, P., Kostner, K., & Punyadeera, C. (2011). Diagnostic potential of saliva: Current state and future applications. *Clinical Chemistry*, 57(5), 675–687. <https://doi.org/10.1373/clinchem.2010.153767>
- Prasad, S., Tyagi, A. K., & Aggarwal, B. B. (2015). Detection of inflammatory biomarkers in saliva and urine: Potential in diagnosis, prevention, and treatment for chronic diseases. *Experimental Biology and Medicine*, 241(8), 783–799. <https://doi.org/10.1177/1535370216638770>
- Pries, R., & Wollenberg, B. (2006). Cytokines in head and neck cancer. *Cytokine and Growth Factor Reviews*, 17(3), 141–146. <https://doi.org/10.1016/j.cytogfr.2006.02.001>
- Rahim, M. A. A., Abdul Rahim, Z. H., Wan Ahmad, W. A., & Hashim, O. H. (2015). Can

- saliva proteins be used to predict the onset of acute myocardial infarction among high-risk patients? *International Journal of Medical Sciences*, 12(4), 329–335.
<https://doi.org/10.7150/ijms.11280>
- Rathnayake, N., Åkerman, S., Klinge, B., Lundegren, N., Jansson, H., Tryselius, Y., ... Gustafsson, A. (2013). Salivary biomarkers of oral health - A cross-sectional study. *Journal of Clinical Periodontology*, 40(2), 140–147. <https://doi.org/10.1111/jcpe.12038>
- Rathnayake, N., Gieselmann, D.-R., Heikkinen, A., Tervahartiala, T., & Sorsa, T. (2017). Salivary Diagnostics—Point-of-Care diagnostics of MMP-8 in dentistry and medicine. *Diagnostics*, 7(1), 7. <https://doi.org/10.3390/diagnostics7010007>
- Ravindranath, N. M. H., & Shuler, C. (2007). Cell-surface density of complement restriction factors (CD46, CD55, and CD59): oral squamous cell carcinoma versus other solid tumors. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology and Endodontology*, 103(2), 231–239. <https://doi.org/10.1016/j.tripleo.2006.05.028>
- Rhee, E. P., & Gerszten, R. E. (2012). Metabolomics and cardiovascular biomarker discovery. *Clinical Chemistry*, 58(1), 139–147.
<https://doi.org/10.1373/clinchem.2011.169573>
- Salminen, A., Gursoy, U. K., Paju, S., Hyvärinen, K., Mäntylä, P., Könönen, E., ... Pussinen, P. J. (2014). Salivary biomarkers of bacterial burden, inflammatory response, and tissue destruction in periodontitis. *Journal of Clinical Periodontology*, 41(5), 442–450.
<https://doi.org/10.1111/jcpe.12234>
- Salminen, A., Kopra, K. A. E., Hyvärinen, K., Paju, S., Mäntylä, P., Buhlin, K., ... Pussinen, P. J. (2015). Quantitative PCR analysis of salivary pathogen burden in periodontitis. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 5(October), 1–10.
<https://doi.org/10.3389/fcimb.2015.00069>
- Sexton, W. M., Lin, Y., Kryscio, R. J., Dawson, D. R., Ebersole, J. L., & Miller, C. S. (2011). Salivary biomarkers of periodontal disease in response to treatment. *Journal of Clinical Periodontology*, 38(5), 434–441. <https://doi.org/10.1111/j.1600-051X.2011.01706.x>
- Silla, J. A., & Company, J. M. (2013). Riesgo de caries: Evaluación y control. In Odontología preventiva y comunitaria. In E. C. Sala & P. B. García (Eds.), *Odontología preventiva y comunitaria* (4th ed., p. 110). Barcelona: Elsevier España.
- Slowey, P. D. (2015). Saliva collection devices and diagnostic platforms. In *Advances in Salivary Diagnostics* (pp. 33–61). https://doi.org/10.1007/978-3-662-45399-5_3
- Sorsa, T., Heikkinen, A. M., Leppilähti, J., Tervahartiala, T., Nwhator, S., Rathnayake, N., ... Netuschil, L. (2017). Active matrix metalloproteinase-8: Contributor to periodontitis and

- a missing link between genetics, dentistry, and medicine. In *Pathogenesis of Periodontal Diseases: Biological Concepts for Clinicians* (pp. 51–57). https://doi.org/10.1007/978-3-319-53737-5_5
- Spielmann, N., & Wong, D. (2011). Saliva: Diagnostics and therapeutic perspectives. *Oral Diseases*. <https://doi.org/10.1111/j.1601-0825.2010.01773.x>
- Sugimoto, M., Wong, D. T., Hirayama, A., Soga, T., & Tomita, M. (2010). Capillary electrophoresis mass spectrometry-based saliva metabolomics identified oral, breast and pancreatic cancer-specific profiles. *Metabolomics*, 6(1), 78–95. <https://doi.org/10.1007/s11306-009-0178-y>
- Tao, R., Jurevic, R. J., Coulton, K. K., Tsutsui, M. T., Roberts, M. C., Kimball, J. R., ... Dale, B. A. (2005). Salivary Antimicrobial Peptide Expression and Dental Caries Experience in Children. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 49(9), 3883–3888. <https://doi.org/10.1128/AAC.49.9.3883>
- Taylor, J. J. (2014). Protein Biomarkers of Periodontitis in Saliva. *ISRN Inflammation*, 2014(Cvd), 1–18. <https://doi.org/10.1155/2014/593151>
- Tellez, M., Gomez, J., Pretty, I., Ellwood, R., & Ismail, A. (2013). Evidence on existing caries risk assessment systems: Are they predictive of future caries? In *Community Dentistry and Oral Epidemiology* (Vol. 41, pp. 67–78). <https://doi.org/10.1111/cdoe.12003>
- Tulunoglu, Ö., Demirtas, S., & Tulunoglu, I. (2006). Total antioxidant levels of saliva in children related to caries, age, and gender. *International Journal of Paediatric Dentistry*, 16(3), 186–191. <https://doi.org/10.1111/j.1365-263X.2006.00733.x>
- Unoki, M., & Nakamura, Y. (2001). Growth-suppressive effects of BPOZ and EGR2, two genes involved in the PTEN signaling pathway. *Oncogene*, 20(33), 4457–4465. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1204608>
- Vajaria, B. N., Patel, K. R., Begum, R., Shah, F. D., Patel, J. B., Shukla, S. N., & Patel, P. S. (2013). Evaluation of serum and salivary total sialic acid and α -L-fucosidase in patients with oral precancerous conditions and oral cancer. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology and Oral Radiology*, 115(6), 764–771. <https://doi.org/10.1016/j.oooo.2013.01.004>
- Van Nieuw Amerongen, A., Bolscher, J. G. M., & Veerman, E. C. I. (2004). Salivary proteins: Protective and diagnostic value in cariology? *Caries Research*, 38(3), 247–253. <https://doi.org/10.1159/000077762>
- Vicari, A. P., & Caux, C. (2002). Chemokines in cancer. *Cytokine and Growth Factor*

- Reviews*. [https://doi.org/10.1016/S1359-6101\(01\)00033-8](https://doi.org/10.1016/S1359-6101(01)00033-8)
- Wang, A., Wang, C. P., Tu, M., & Wong, D. T. W. (2016). Oral biofluid biomarker research: Current status and emerging frontiers. *Diagnostics*, 6(4), 1–16.
<https://doi.org/10.3390/diagnostics6040045>
- Wang, Q., Gao, P., Wang, X., & Duan, Y. (2014). Investigation and identification of potential biomarkers in human saliva for the early diagnosis of oral squamous cell carcinoma. *Clinica Chimica Acta*, 427, 79–85. <https://doi.org/10.1016/j.cca.2013.10.004>
- Warnakulasuriya, S. (2009). Global epidemiology of oral and oropharyngeal cancer. *Oral Oncology*, 45(4–5), 309–316. <https://doi.org/10.1016/j.oraloncology.2008.06.002>
- Whembolua, G. L. S., Granger, D. A., Singer, S., Kivlighan, K. T., & Marguin, J. A. (2006). Bacteria in the oral mucosa and its effects on the measurement of cortisol, dehydroepiandrosterone, and testosterone in saliva. *Hormones and Behavior*, 49(4), 478–483. <https://doi.org/10.1016/j.yhbeh.2005.10.005>
- Yoshizawa, J. M., Schafer, C. A., Schafer, J. J., Farrell, J. J., Paster, B. J., & Wong, D. T. W. (2013). Salivary biomarkers: Toward future clinical and diagnostic utilities. *Clinical Microbiology Reviews*, 26(4), 781–791. <https://doi.org/10.1128/CMR.00021-13>
- Zhang, A., Sun, H., Wang, P., & Wang, X. (2013). Salivary proteomics in biomedical research. *Clinica Chimica Acta*, 415, 261–265. <https://doi.org/10.1016/j.cca.2012.11.001>
- Zhang, Y., Sun, J., Lin, C. C., Abemayor, E., Wang, M. B., & Wong, D. T. W. (2016). The emerging landscape of salivary diagnostics. *Periodontology 2000*, 70(1), 38–52.
<https://doi.org/10.1111/prd.12099>
- Zhao, A., Blackburn, C., Chin, J., & Srinivasan, M. (2014). Soluble toll like receptor 2 (TLR-2) is increased in saliva of children with dental caries. *BMC Oral Health*, 14(1), 1–5.
<https://doi.org/10.1186/1472-6831-14-108>